

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Gréta Grendelová

Izotopový profil jedincov so známou osteobiografickou dokumentáciou a jeho využitie pre
štúdium minulých populácií

Isotopic profile of individuals with known osteobiographic documentation and its use for a
study of past populations

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Sylva Drtikolová Kaupová, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Petr Velemínský, Ph.D. a Mgr. Jan Cvrček

Praha, 2019

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí v prvej rade Mgr. Sylve Drtikolovej Kaupovej, Ph.D. za drahocenný čas a trpezlivosť počas celej doby písania diplomovej práce. Ďalej ďakujem konzultantom RNDr. Petrovi Velemínskému, Ph.D. za cenné odborné rady a Mgr. Janovi Cvrčkovi za poskytnutie kostného materiálu a za pomoc pri jeho spracovaní, a tiež celému kolektívu Antropologického oddelenia Národného múzea. Pod'akovanie patrí tiež Mgr. Alene Černíkovej, Ph.D. za konzultácie a pomoc so štatistickým spracovaním dát.

Taktiež by som sa chcela pod'akovať rodine, Vojtěchovi a ostatným blízkym, ktorí mi boli pri písaní tejto práce veľkou oporou.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 29.4. 2019

Abstrakt

Diplomová práca sa venuje vplyvu biologických, socioekonomických, environmentálnych, a predovšetkým fyziologických a patofyziologických faktorov na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ kostného kolagénu jedincov s kompletnou osteobiografickou dokumentáciou. Doposiaľ bola izotopová analýza využívaná k rekonštrukcii stravy minulých populácií, bez uvažovania nad vplyvom nevýživových faktorov. Cieľom práce je popísať vplyv spomínaných faktorov na izotopové hodnoty uhlíka a dusíka v kostnom tkanive jedincov.

Materiál bol podrobený analýze stabilných izotopov. V práci bol analyzovaný kostný kolagén rebier a stehenných kostí 45 jedincov (27 mužov a 18 žien), ktorí boli členmi niekoľkých príbuznených rodín a obývali územie Českej republiky počas 19.-21. storočia. Vekové rozpätie súboru bolo 20-90 rokov. Pre správnu interpretáciu výsledkov bol analyzovaný i referenčný súbor zložený z ôsmich vzoriek rôznych druhov zvierat.

V diplomovej práci boli preukázané signifikantné izotopové rozdiely medzi rodinami s odlišným sociálnym statusom. Jedinci s vyšším postavením vykazovali vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$. Dátum úmrtia jedinca sa tiež odrazil na izotopových hodnotách, neskôr žijúci jedinci vykazovali mierne znížené hodnoty $\delta^{15}\text{N}$, čo môže byť spôsobené zmenou životného prostredia. Vek dožitia, zdravotný stav ani tehotenstvo u žien nemali preukázateľný efekt na izotopové hodnoty v kostnom kolagéne študovaných jedincov. Rozdiel medzi chronickým ochorením a náhlým úmrtím nemal vplyv na izotopové hodnoty uhlíka ani dusíka. Výsledky diplomovej práce preukázali, že izotopové hodnoty uhlíka a dusíka skôr odrážajú environmentálne a socioekonomické vplyvy a stravu jedinca, ako zdravotný stav organizmu.

Kľúčové slová: analýza stabilných izotopov, osteobiografický profil, obmena kolagénu, rýchlosť remodelácie, patofyziologické faktory

Abstract

This diploma thesis deals with the influence of biological, socioeconomic, environmental and also physiological and pathophysiological factors on isotopic ratios of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ bone collagen of individuals with complete osteobiographic documentation. So far, isotope analysis has been used to reconstruct the diet of past populations, without considering the effect of non-nutritive factors. The aim of this work is to describe the effect of these factors on isotopic values of carbon and nitrogen in bone tissue of individuals.

The material was processed by the stable isotope analysis. The bone collagen of ribs and femurs of 45 individuals (27 males and 18 females) who were members of several related families and occupied the territory of the Czech Republic during 19th-21st century was analysed. The age range of the subjects was 20-90 years. For correct interpretation of the results, a reference set consisting of eight samples of different animal species was analysed.

Significant isotope differences between families with different social status have been demonstrated in this thesis. Individuals with higher status showed higher $\delta^{15}\text{N}$ values. The year of death of the individual was also reflected in isotopic values, and later living individuals showed slightly reduced $\delta^{15}\text{N}$, which may be due to environmental change. The age, health, or pregnancy in females did not have a demonstrable effect on isotopic values in bone collagen of subjects. The difference between chronic disease and sudden death did not affect the isotopic ratios of carbon or nitrogen. The results of the diploma thesis showed that the isotopic ratios of carbon and nitrogen reflect the environmental and socioeconomic impacts and the diet of the individual, rather than the health status of the organism.

Key words: stable isotope analysis, an osteobiographic profile, bone collagen, collagen turnover, pathophysiological factors

Zoznam skratiek

AK	aminokyselina
ANOVA	analysis of variance (analýza rozptylu)
CAM	crassulacean acid metabolism
DM	diabetes mellitus
M	muž
NAIR	nitrogene ambient inhalable reservoir (vzdušný dusík)
RuBisCO	ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza
SD	standard deviation (smerodajná odchýlka)
SES	socioekonomický status
TBC	tuberkulóza
TNF- α	tumor necrosis factor alpha (faktor nádorovej nekrózy alfa)
(V)PDB	Vienna Pee Dee Belemnite
Ž	žena

Obsah

1	Úvod	8
2	Stabilné izotopy a ich analýza	9
2.1	Stabilný izotop uhlíka $\delta^{13}\text{C}$	10
2.2	Stabilný izotop dusíka $\delta^{15}\text{N}$	12
3	Rekonštrukcia stravy za pomoci stabilných izotopov	14
4	Mineralizované tkanivá	17
4.1	Kolagén	18
4.2	Bioapatit	19
4.3	Nemineralizované tkanivá	19
5	Základné poznatky o metabolizme proteínov	21
5.1	Zastúpenie aminokyselín v kolagéne	25
5.2	Hormonálna regulácia proteínového metabolizmu	26
6	Pozitívna a negatívna dusíková bilancia	28
6.1	Stav pozitívnej dusíkovej rovnováhy	29
6.1.1	Tehotenstvo	29
6.2	Stav negatívnej dusíkovej rovnováhy	30
6.2.1	Nutričný stres	30
7	Izotopová analýza patologického kostného tkaniva	32
7.1	Ochorenia kostí	32
7.2	Zranenie	33
7.3	Rakovina	34
7.4	Diabetes mellitus 2. typu a obezita	34
7.5	Srdcové vady	35
7.6	Reumatoidná artritída	35
7.7	Infekcia	35
7.8	Tuberkulóza	36
8	Environmentálne faktory	38
8.1	Vlhkosť	38
8.2	Hnojenie	38
8.3	„The Suess effect“	39
9	Ciele práce a hypotézy	40
10	Materiál	43
10.1	Ľudské vzorky	43
10.2	Zvieracie vzorky	48

11	Metódy	50
11.1	Príprava kostného materiálu	50
11.2	Extrakcia kolagénu	51
11.2.1	Demineralizácia	52
11.2.2	Purifikácia	52
11.2.3	Solubilizácia	52
11.2.4	Dehydratácia	52
11.3	Analýza kolagénu	53
11.4	Hodnotenie vzoriek	53
11.4.1	Zachovalosť kostí	53
11.4.2	Kvalita vzoriek	54
11.5	Štatistické vyhodnotenie vzoriek	56
12	Výsledky	59
12.1	Zvieracie vzorky	59
12.2	Ľudské vzorky	60
12.3	Závislosť izotopových hodnôt na dátume úmrtia	65
12.4	Vzťah medzi izotopovými hodnotami a typom kosti	72
12.5	Závislosť izotopových hodnôt na pohlaví	74
12.6	Závislosť izotopových hodnôt na príslušnosti k rodine	76
12.7	Závislosť izotopových hodnôt na zdravotnom stave	81
12.8	Závislosť izotopových hodnôt na veku dožitia	87
12.9	Závislosť izotopových hodnôt na počte pôrodov a počte rokov od posledného pôrodu	88
12.10	Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na piatich premenných	91
13	Diskusia	93
13.1	Analýza zvieracích a ľudských vzoriek	93
13.2	Dátum úmrtia	94
13.3	Rozdiely izotopových pomerov medzi rôznym typom kostí rovnakého jedinca	96
13.4	Pohlavie	98
13.5	Príslušnosť k rodine	99
13.6	Vek dožitia	101
13.7	Zdravotný stav	102
13.8	Počet pôrodov a počet rokov od posledného pôrodu	105
14	Záver	107
15	Zoznam použitej literatúry	108
16	Prílohy	122

1 Úvod

Analýza stabilných izotopov prvkov, predovšetkým uhlíka a dusíka, je v súčasnosti rutinne využívanou metódou bioarcheologického výskumu (Reitsema 2013; Lee Thorp 2008; Ambrose et al. 1997; Schwarcz & Schoeninger 1991; DeNiro & Epstein 1981). Využitie analýzy sa našlo hlavne v oblasti rekonštrukcie stravy minulých populácií a určenie pozície organizmu v trofickom reťazci (Smith & Epstein 1971; Minagawa & Wada 1984; Schoeninger & DeNiro 1984).

Nová oblasť výskumu je zameraná na vplyv fyziologických a patofyziologických faktorov na izotopové pomery uhlíka a dusíka v kostnom tkanive človeka, avšak práce na túto tému sú zaťažené niekoľkými komplikáciami, a preto je experimentálnych štúdií doposiaľ minimum. Výsledky doterajších výskumov naznačujú, že izotopové zmeny, ktoré boli zaznamenané v rýchlo sa obmieňajúcich mäkkých tkanivách alebo telesných tekutinách, nie je možné analogicky preniesť na pomaly sa remodelujúce kostné tkanivo (Hatch 2012; Nitsch et al. 2010). Využitie zvieracích modelov je nápomocné, je však nevyhnutné uvažovať nad rozdielmi vo fyziológii jednotlivých druhov (Reitsema 2013; Hobson et al. 1993). Jedinou cestou tak ostáva analýza kostného tkaniva na súbore jedincov so známymi osteobiografickými údajmi. Pre malý počet takýchto súborov s často nedostatočnou dokumentáciou a malou veľkosťou vzorky, zostávajú podobné štúdie výnimkou (Beaumont et al. 2013; Nitsch et al. 2010; Katzenberg & Lovell 1999).

Diplomová práca sa zaoberá izotopovou analýzou kostného kolagénu rebier a stehenných kostí, čiže kostí s rôznou rýchlosťou remodelácie tkaniva (Fahy et al. 2017; Lamb et al. 2014; Hedges et al. 2007), jedincov s kompletnou osteobiografickou dokumentáciou.

Cieľom diplomovej práce bolo zohľadniť zmeny v izotopových pomeroch uhlíka a dusíka vplyvom biologických, socioekonomických, environmentálnych, ale predovšetkým fyziologických a patofyziologických faktorov, a to na základe poskytnutých údajov o presnom veku dožitia, dátume úmrtia, sociálnom statuse, zdravotnom stave a počte pôrodov k študovanému súboru jedincov (Cvrček et al. 2018).

2 Stabilné izotopy a ich analýza

Izotopové nuklidy, skrátené izotopy, sú súbory atómov toho istého prvku s rovnakým protónovým a rozdielnym nukleónovým číslom. Izotopy toho istého prvku sa vzájomne líšia relatívnou atómovou hmotnosťou, čo následne ovplyvňuje výslednú relatívnu atómovú hmotnosť celého prvku. To vedie k rôznej reakčnej kinetike, tým pádom aj k rôznym väzbovým energiám (Schoeller 1999). Izotopy jedného prvku majú teda rovnaké chemické a rôzne fyzikálne vlastnosti (Schoeninger 2010).

Izotopy rôznych prvkov sa v prírode i živých organizmoch zúčastňujú rôznych biochemických dejov. Človek ich do tela prijíma vo forme živín z potravy, kde sa následne zúčastňujú metabolických reakcií a sú podľa potreby konzumenta distribuované do jednotlivých tkanív. Všetky tkanivá ľudského tela sa navzájom líšia svojím izotopovým zložením (Schoeller 1999; Tieszen et al. 1983). Vzťah medzi množstvom izotopov v prijímanej potrave a organizme nie je priamy, ovplyvňuje ho fyziologická stavba tela konzumenta v procese tzv. frakcionizácie. Izotopová frakcionizácia je spôsobená tým, že väzby ľahších izotopov (napríklad ^{12}C) sú slabšie ako väzby ťažkých izotopov toho istého prvku (^{13}C), a preto sa dajú jednoduchšie narušiť počas fyzikálnych a chemických procesov. Ide o čiastočnú nerovnomernú separáciu izotopov rovnakého prvku (DeNiro & Epstein 1981; Schoeninger & DeNiro 1984; Steele & Daniel 1978; Peterson & Fry 1987; Schwarcz & Schoeninger 1991). Chemické prvky sú ďalej predávané medzi organizmami v rámci potravných reťazcov. Frakcionizácia dusíka nastáva hlavne v opakovaných procesoch deaminácie a transaminácie aminokyselín (Macko et al. 1982, Minagawa & Wada 1984).

V prírode sa prirodzene vyskytuje množstvo izotopov, z nich je väčšina stabilných. Ten istý prvok sa môže vyskytovať vo forme stabilných i nestabilných, rádioaktívnych izotopov. Jedným z nich je napríklad uhlík. V prírode sa okrem stabilných izotopov ^{12}C ^{13}C , vyskytuje aj nestabilný izotop uhlíku ^{14}C , ktorý našiel uplatnenie pri rádiokarbónovom datovaní archeologických nálezov (Farquhar et al. 1989).

Priame vyjadrenie pomeru ľahkého a ťažkého izotopu nie je zaužívané, nakoľko sú zmeny týchto izotopov príliš malé. Preto sa uvádza pomer izotopov vo vzorke (napr. $\delta^{13}\text{C}$) ako podiel izotopového pomeru vzorky ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{vzorky}}$) oproti štandardu ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{(\text{V})\text{PDB}}$), vztiahnutý na štandard, a vypočítaný pomocou rovnice:

$$\delta X = (Ra/Rb - 1) \times 1000$$

- δX = podiel izotopového pomeru vzorky ku štandardu
- X = príslušný ťažší izotop
- Ra = izotopový pomer vzorky
- Rb = izotopový pomer štandardu
- výsledok je vyjadrený v ‰ (Peterson & Fry 1987; Schwarcz & Schoeninger 1991)

Štandard pre dusík je označovaný ako NAIR (*Nitrogene Ambient Inhalable Reservoir*), vzdušný dusík. Jedná sa o pomer $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ v atmosfére (Peterson & Fry 1987). Táto hodnota je na rozdiel od hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ atmosférického uhlíka CO_2 stabilná. Zvýšenou industrializáciou dochádza k rapídному poklesu hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ (Francey et al. 1999). Ako štandard uhlíku sa preto v minulosti používala morská fosília belemnita *Belemnitella americana* z oblasti Pee Dee v Južnej Karolíne, ktorá má abnormálne vysoký pomer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, väčšina biologických vzoriek má z tohto dôvodu záporné hodnoty. Zásoby tejto fosílie však boli spotrebované a posledné roky sú nahradené novým štandardom (V)PDB – *Vienna Pee Dee Belemnite* (Smith & Epstein 1971).

2.1 Stabilný izotop uhlíka $\delta^{13}\text{C}$

Zloženie izotopov uhlíka v prírode je nasledovné:

- ^{12}C – 98,9 ‰ (stabilný)
- ^{13}C – 1,1 ‰ (stabilný)
- ^{14}C (rádioaktívny (Farquhar et al. 1989)).

Zdrojom uhlíka v terestrických ekosystémoch je vzdušný uhlík CO_2 , fixovaný rastlinami. Počas fotosyntézy sa z neho vytvárajú zložitejšie organické zlúčeniny (Schwarcz & Schoeninger 1991). Práve vtedy dochádza k najväčšej frakcionizácii izotopu uhlíka. Kolobeh uhlíka v prírode je založený na biochemickom procese enzýmu RuBisCO (ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza). V rastlinách s C_3 metabolizmom sa do novo vytvorených uhlíkových zlúčenín uprednostnene zabudováva ľahší izotop ^{12}C , a to s preferenciou zhruba 20-40 ‰

(O'Leary 1981). V ďalších krokoch počas fixácie CO₂ nadobúdajú hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ charakteristické hodnoty pre C3 skupinu rastlín, ktoré ležia v rozmedzí -34 až -24 ‰ (Smith & Epstein 1971; O'Leary 1981; Farquhar et al. 1989). U C4 rastlín je atmosférický CO₂ najskôr fixovaný pomocou PEP karboxylázy a až potom spracovaný enzýmom RuBisCO v bunkách cievneho zväzku, čo vedie k oveľa menším stratám CO₂. Enzymatická preferencia pre ^{12}C sa neprejaví tak výrazne, ako u C3 rastlín. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v C4 rastlinách, ktoré tak ovplyvňuje hlavne difúzia CO₂, sa pohybujú medzi -19 až -6 ‰ (Smith & Epstein 1971; O'Leary 1981; Farquhar et al. 1989). Poslednou skupinou rastlín sú CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) rastliny, napríklad sukulent, ktoré dokážu využívať obe metabolické dráhy a svojimi hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ležia medzi C3 a C4 rastlinami (O'Leary 1981; Hoefs 2009).

V sladkovodných ekosystémoch rastliny využívajú ako zdroj uhlík rozpustený v CO₂ i HCO₃⁻, preto sú hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ veľmi variabilné a ležia v intervale -21 ‰ až 1 ‰ (Osmond et al. 1981; Keeley & Sandquist 1992). Vo vodnom prostredí množstvo uhlíka v rastlinách ovplyvňujú aj iné faktory, ako prítomnosť inej vodnej flóry či fauny a ich dekompozícia, skalné podložie rastlín, a tiež samotné vlastnosti vody (Osmond et al. 1981; Keeley & Sandquist 1992). Vo vodnom prostredí sa okolo rastliny vytvorí „obal“, ktorý kvôli nižšej difúzii CO₂ vo vode v porovnaní so vzduchom obmedzí výmenu uhlíku s prostredím, a tak rastliny musia využiť aj inak diskriminovaný ťažší izotop ^{13}C . Pri pomalšom prúde je obal okolo rastliny silnejší, dochádza k menšej výmene uhlíku a väčšiemu pôsobeniu proti francionizácii enzýmom RuBisCO. Kvôli vysokej variabilite jednotlivých sladkovodných ekosystémov, ktorá následne ovplyvňuje hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v rastlinách a ich konzumentoch, je dôležitá správna charakteristika týchto ekosystémov. To následne ovplyvní správnu interpretáciu výsledkov, napríklad pri rekonštrukcii výživy (Osmond et al. 1981; Keeley & Sandquist 1992).

V morskom prostredí je hlavný zdroj uhlíku bikarbonát rozpustený vo vode, ktorého hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ sa blížia štandardu (Ambrose et al. 1997; Lee-Thorp 2008). Variabilita v uhlíkových hodnotách nie je tak široká, ako v sladkovodných ekosystémoch, preto je možné v rastlinách sledovať fotosyntetickú fracionizáciu podobne, ako je tomu v terestrických ekosystémoch. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ sú však kvôli rozdielnemu pôvodu zvýšené, morské druhy, ktoré využívajú C3 metabolizmus sa radia medzi terestrické C3 a C4 rastliny (Smith & Epstein 1971). Izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v morských rybách sú v rozmedzí -19 ‰ až -11 ‰ (Barrett et al. 2008). Hodnotu $\delta^{13}\text{C}$ spolu s vyššími hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ je možné využiť k identifikácii konzumácie morských zdrojov v rekonštrukcii výživy skúmaného jedinca (Schoeninger & DeNiro 1984; Ambrose et al. 1997).

Z producentov sa hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ďalej prenášajú na rastlinných konzumentov a následne na konzumentov vyšších rádov, vrátane človeka. U bylinožravcov dochádza oproti strave k zvýšeniu $\delta^{13}\text{C}$ o približne 7 ‰, u mäsožravcov je to zvýšenie asi o 4 ‰. Medzi konzumentami vyšších rádov ide o mierne zvýšenie $\delta^{13}\text{C}$ asi o 1 ‰, hodnota môže kolísať v závislosti na zložení stravy či typu tkaniva (DeNiro & Epstein 1978; Lee-Thorp 2008; Fernandes et al. 2012). Samotná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ bez poznania stravy skúmaného organizmu či typu tkaniva nijak nevypovedá o jeho trofickej úrovni (Schoeninger & DeNiro 1984).

Obsah izotopu ^{13}C možno stanoviť z organickej i anorganickej zložky kostného tkaniva. V bioarcheológii sa pomer stabilných izotopov uhlíka využíva na určenie konzumácie rastlinnej potravy, odhalí majoritné zastúpenie C3 (rastliny mierneho pásma, predovšetkým ekonomicky významná pšenica či ryža) alebo C4 (rastliny teplého a suchého prostredia ako proso, kukurica, cukrová trstina) rastlinách v strave, a takisto pomáha určiť trofické postavenie organizmu reťazci (Lee-Thorp 2008).

2.2 Stabilný izotop dusíka $\delta^{15}\text{N}$

Dusík je v ľudskom tele viazaný predovšetkým v bielkovinách (98 %), zvyšok sa nachádza v nukleových kyselinách či močovine (Welle 2012). Stanovenie hladín izotopu dusíka v organizme slúži k zisteniu trofickej úrovne. Pomer stabilných izotopov dusíka (^{15}N : ^{14}N) sa mení v závislosti na pozícii v trofickom reťazci a je daný predovšetkým exkréciou ľahkého izotopu ^{14}N v moči (Steele & Daniel 1978; Peterson & Fry 1987; Roth & Hobson 2011). Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sa na každom stupni reťazca zvyšujú o približne 3-5 ‰, smerom od producentov ku konzumentom vyšších rádov (Minagawa & Wada 1984; Schoeninger & DeNiro 1984; Post 2002; Webb et al. 2016). Podľa O'Connell et al. (2012) je nárast v ľudskom kolagéne okolo 6 ‰, čo by znamenalo, že príjem živočíšnych proteínov bol v minulosti nadhodnotený v rôznych štúdiách historických populácií. Keďže trofické reťazce vo vodných (sladkovodných i morských) ekosystémoch sú zvyčajne komplexnejšie a dlhšie než suchozemské, a takisto s prihliadnutím na fakt, že väčšina morských primárnych producentov má zhruba o 4 ‰ vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ než suchozemských, je pomocou stanovenia dusíkových hodnôt možné odhaliť využívanie vodných zdrojov potravy (Wada et al. 1975; Schoeninger & DeNiro 1984; Webb et al. 2016). Ryby či morské cicavce majú následkom toho zvýšené hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ (Fuller et al. 2012). Navyše, ryby – predátori rastú s vekom, vzhľadom na rôznorodosť svojej koristi, ktorá zahŕňa iné ryby, obojživelníky či dokonca malé cicavce. Tým sa môžu jednotlivé živočíchy v rámci toho istého druhu odlišovať v izotopových hodnotách $\delta^{15}\text{N}$, ktoré sa zvyšujú s ich

vekom a veľkosťou (Sweeting et al. 2007). Viac vodných zdrojov v strave, sladkovodných i morských, vedie k nárastu $\delta^{15}\text{N}$ u jedinca (Schoeninger et al. 1983).

Suchozemské rastliny získavajú dusík dvomi spôsobmi. Prvým z nich je asimilácia dusíka z pôdy, pričom hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ závisia na type a vlastnostiach pôdy a zdroji dusíka, preto môžu byť výrazne variabilné, najčastejšie však ležia v intervale 0-7 ‰ (Wada et al. 1975; Schoeninger & DeNiro 1984). Druhým spôsobom je fixácia atmosférického N_2 pomocou symbiotických baktérii z koreňov. V tomto prípade rastliny vykazujú v priemere nižšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ s menšou variabilitou (Schoeninger & DeNiro 1984), čo sa využíva aj v izotopovej analýze. Príkladom takýchto rastlín sú rôzne druhy strukovín. Strukoviny sú schopné zmeny atmosférického dusíku bez frakcionizácie, a to vďaka svojim symbiotickým baktériám, preto sú hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v strukovinách blízke 0 ‰. Keď sú však konzumované vo väčších porciách a častejšie, je možné, že aspoň zľahka ovplyvnia efekt konzumácie živočíšnych proteínov (Klepinger 1984; Schwarcz & Schoeninger 1991).

3 Rekonštrukcia stravy za pomoci stabilných izotopov

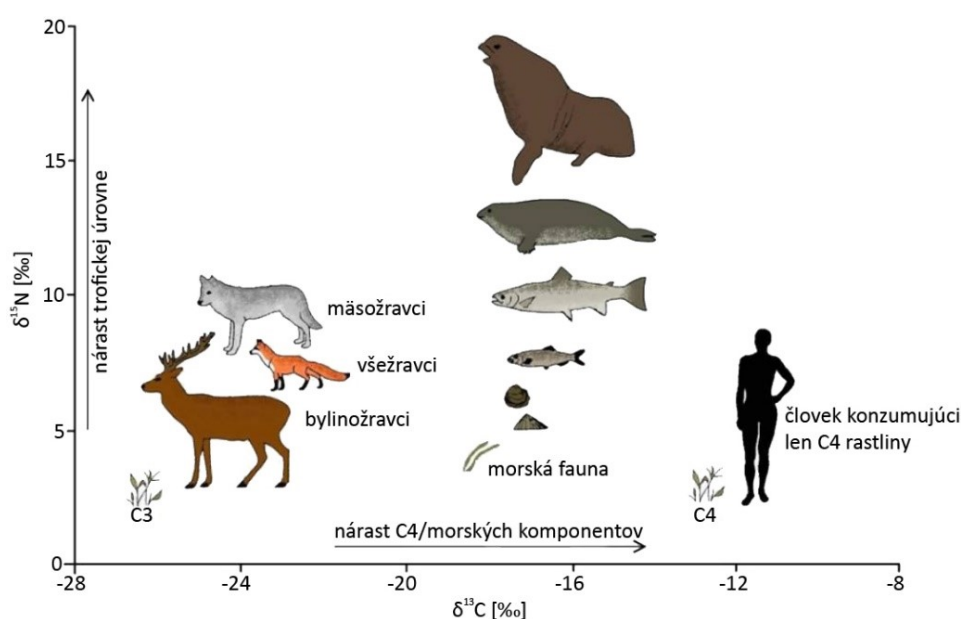
Analýza stabilných izotopov uhlíka a dusíka z mäkkých aj mineralizovaných tkanív je priamou a širokospektrálne využívanou technikou v celej škále prírodných vied. Má význam v rekonštrukcii života archeologických populácií, a to predovšetkým v charakterizovaní ich subsistenčných zdrojov (Ambrose et al. 1997; Privat et al. 2002; Mays & Beavan 2012). Vďaka tomu možno dobre sledovať aj rozšírenie hlavných zdrojov potravín na rôznych územiach v rôznych historických obdobiach, napríklad pri sledovaní šírenia pestovania kukurice na americkom kontinente, ako takmer výhradného zdroja C4 rastlín v ich strave (Vogel & van der Merwe 1977). Podobný výskum sa v minulých rokoch zameriaval na sledovanie rozšírenia prosa v Európe (Tafuri et al. 2009; Reitsema et al. 2013).

Prvé výskumy, ktoré aplikovali izotopovú analýzu k modelovaniu stravy, sa odohrali v sedemdesiatych rokoch minulého storočia (van der Merwe & Vogel 1978; Vogel & van der Merwe 1978). Odvtedy tento vedný odbor značne pokročil. Spočiatku sa analýza stabilných izotopov ľahkých prvkov, ako je kyslík, vodík, siera, uhlík či dusík, využívala pre štúdium biochemických a metabolických dejov, v ekológii našla uplatnenie v objasnení fungovania ekosystémov a ekologických interakcií (Peterson & Fry 1987).

Izotopové analýzy využívané k hodnoteniu stavu výživy sú založené na fakte, že telá všetkých živočíchov sú tvorené látkami, ktoré organizmus prijíma zo svojho okolia, predovšetkým potravou. Po vstupe do tela podliehajú tieto látky rozličným biochemickým procesom a sú využívané ako zdroje energie či stavebné kamene telesných štruktúr a tkanív. Tak sa v tele organizmu dokážu uchovať po veľmi dlhú dobu, v závislosti na type tkaniva. Vďaka znalosti ekologických a trofických dejov môžeme spätne vysledovať pôvod jednotlivých látok a prvkov a určiť typ stravy, ktorý minulé populácie preferovali alebo im bol dostupný, či priblížiť ich životné prostredie (van der Merwe & Vogel 1978, Reitsema & Vercellotti 2012).

Aj napriek tomu, že pomocou izotopovej analýzy nie je možné poskytnúť presné informácie o konkrétnych potravinách či pokrmoch, a takisto nedokážu bezchybne rozlíšiť jednotlivé živočíšne produkty (či bolo zdrojom potravy mlieko alebo mäso z konkrétneho živočícha), stále zostávajú výsledky týchto analýz dôležitým nástrojom k lepšiemu poznaniu stravovacích návykov v minulosti (Minagawa 1992; O'Connell & Hedges 1999).

Stabilný izotop uhlíka nás informuje o ekosystéme konzumenta, pričom rozlišuje medzi suchozemským a vodnými prostrediami. Takisto vie určiť, či bol ekosystém založený na C3 (mierne klimatické prostredie) alebo C4 (suché a teplé prostredie) rastlinách. Hodnoty stabilného izotopu dusíka zas odrážajú pozíciu jedinca v potravnom reťazci a možno nimi rozlíšiť, či bol skúmaný organizmus bylinožravec, mäsožravec či všežravec (viď Obr. 3.1). Vzhľadom na to, sú hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ využívané k dokázaniu relatívnej dôležitosti rastlinných či živočíšnych produktov vo výžive človeka (Ambrose & Norr 1993; DeNiro & Epstein 1978; 1981; Lee-Thorp 2008; Minagawa & Wada 1984; Schoeninger & DeNiro 1984).



Obr. 3.1: Graf s hodnotami stabilných izotopov uhlíka a dusíka zobrazuje odlišné umiestnenie organizmov na základe ich potravinovej stratégie (upravené z Schulting 1998)

Pestrosť stravy je pri určení dobrého zdravia prinajmenšom tak dôležitá, ako dostatočný energetický príjem zo stravy. Nevyvážená a monotónna strava výrazne zvyšuje riziko ochorenia a následnú mortalitu. Pre správny rast a vývoj tela, a tiež pre základné funkcie bunky, je nevyhnutné mať stravu obsiahnutú o viac než 50 esenciálnych prvkov. Niektoré z nich si telo dokáže vytvoriť samo, iné musí prijať z potravných zdrojov. Malnutricia je jedným zo spúšťačov rôznych infekčných ochorení. Nedostatočná výživa má nepriamy efekt na zdravotný stav celej populácie. V populáciách vystavených nutričnému stresu sa zvyšuje migrácia v snahe získať viac kvalitnejšej potravy, spolu s tým sa však môžu rozširovať aj infekčné ochorenia (Hockett & Haws 2003; Lee et al. 2011). Vzťah medzi výživou a zdravotným stavom je však v tejto práci viac zameraný na jednotlivcov ako celú populáciu.

Rekonštrukciou stravy minulých populácií pomocou izotopovej analýzy uhlíka a dusíka boli pozorované medzipohlavné a socioekonomické rozdiely v proteínovom zložení stravy. Na výskumoch kostného tkaniva jedincov z obdobia Veľkej Moravy sa ukázalo, že ženy mali vo svojom jedálnom lístku stravu chudobnejšiu na živočíšne proteíny, a teda nižšie izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$, než muži s rovnakým socioekonomickým statusom (SES (Kaupová et al. 2018). Status jedincov bol v týchto výskumoch odhadovaný na základe hrobových výbav. Jedinci z bohatšie vybavených hrobov vykazovali vyšší prísun živočíšnych bielkovín v strave, ktorý sa prejavil aj vo výsledných izotopových hodnotách tak, že izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$, prípadne aj $\delta^{13}\text{C}$, boli zvýšené (Kaupová et al. 2018).

4 Mineralizované tkanivá

V súčasnosti sú na analýzu primárne využívané kalcifikované tkanivá, kosti a zuby, a to z dôvodu ich dostatočnej odolnosti voči degradačným procesom a dochovaniu sa bez výrazných zmien vo vnútornej štruktúre po dlhé storočia (Reitsema & Vercellotti 2012). V historických vzorkách býva analyzovaný kostný a zubný kolagén či minerálne zložky dentínu a zubnej skloviny (Reitsema & Vercellotti 2012; Kaupová et al. 2018).

Zuby sú vytvárané v pomerne útlom veku, a preto poskytujú kvalitné informácie práve z obdobia detskej ontogenézy. Ich tvorba prebieha jednorazovo, a v priebehu života sa ich izotopové zloženie nemení (Reitsema & Vercellotti 2012; Lee-Thorp 2008).

Kosť je živým tkanivom, ktoré sa počas života obmieňa v procese remodelácie a vždy odzrkadľuje priemer požívanej stravy. Štúdie ukázali, že táto zmena sa dramaticky spomaľuje po dosiahnutí dospelosti (Hedges et al. 2007), a navyše sa líši medzi jednotlivými kosťami (Fahy et al. 2017). Kosti s najrýchlejšou obmenou kostného tkaniva sú ramenná kosť, malé kosti ruky či rebrá, naopak pomalou remodeláciou sa vyznačujú kľúčna kosť, vretenná i stehenná kosť (Fahy et al. 2017). Obmena kostného tkaniva rebra je približne 5-10 rokov, u stehennej kosti výrazne presahuje 10 rokov (Lamb et al. 2014; Cox & Sealy 1997; Hedges et al. 2007). Od dvadsiateho do osemdesiateho roku života dochádza k značnému spomaleniu výmeny kostného kolagénu, a to u žien v priemere na 4 %/rok s postupným klesaním na 3 %/rok. U mužov je tento pokles najprv 3 %/rok, postupne sa znižuje na 1,5 %/rok (Hedges et al. 2007). U oboch pohlaví je výmena kolagénu počas rastu v období adolescencie oveľa vyššia – vo veku 10-15 rokov sa jedná o 5-15 %/rok, výraznejšia výmena prebieha u mužských jedincov (Hedges et al. 2007). Výhoda kostí je, že podliehajú remodelácii počas celého života, a preto uchovávajú informácie z veľmi dlhého časového obdobia pred úmrtím jedinca. Zloženie kostného kolagénu nám poukazuje na spôsob stravovania i celkový životný štýl dlhého časového úseku zo života jedinca (Lee-Thorp 2008; van Klinken 1999).

Patofyziologické faktory, ako ochorenie či nutričný stres, môžu ovplyvniť metabolizmus človeka a spôsobiť, že hodnoty stabilných izotopov v tkanivách nezodpovedajú charakteristickej strave jedinca (Hobson et al. 1993; Roth & Hobson 2011; Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). Za normálnych okolností je kosť posledným tkanivom, ktoré je postihnuté krátkodobou zmenou. Pokiaľ je patologický vplyv na kosť výrazný či dlhotrvajúci, preukáže sa i na makroskopickú štruktúru kosti. V takýchto prípadoch však treba brať do úvahy aj tzv.

osteologický paradox¹ (Wood et al. 1992). Preto vo výskumoch zameraných na charakteristickú stravu jedinca je potrebné vylúčiť zo súboru vzoriek kosti s jasným patologickým prejavom. Niekedy však nemusia byť patológie na kosti pozorovateľné, ako v prípade nutričného stresu, ktorý kosť ovplyvňuje veľmi pomaly (Fogel et al., 1989, 1997; Katzenberg et al., 1996).

4.1 Kolagén

Kostné tkanivo sa skladá z dvoch hlavných zložiek, organickej (~23 %) a anorganickej (~77 %) zložky. Hlavnú zložku organickej časti tvorí proteín kolagén (90 %) obohatený o prvky ako uhlík, dusík a síra. Jedná sa o najviac zastúpený proteín v tele cicavcov, podieľa sa asi 25-35 % na celkovom množstve telesných bielkovín. Kolagén podáva prevažne informácie o zložení proteínov v strave. Čím je potrava bohatšia na bielkoviny, tým viac dokáže ovplyvniť kolagénové hodnoty uhlíka (Ambrose & Norr 1993; Jim et al. 2004). Kolagénový uhlík (22,3 %) je získavaný predovšetkým z esenciálnych aminokyselín (z potravy), čo môže viesť k posunu hodnôt tohto uhlíka k proteínovej zložke potravy (Jim et al. 2004; Ambrose & Norr 1993; Schwarcz 2000), keďže aminokyseliny sú produkované reakciou zložky stravy s vlastnými tkanivami organizmu. Pomer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v kolagéne a potrave je odlišný. Kostný kolagén je zvyčajne oproti strave obohatený o približne 4,8 ‰ $\delta^{13}\text{C}$, pretože väzba $\delta^{12}\text{C}$ je ľahšie narušiteľná, a preto sa z organizmu vylúči tohto izotopu viac (Fernandes et al. 2015; Schoeninger 2010).

Z kolagénu stehenných kostí je možné získať informácie o výžive jedinca z časového obdobia výrazne dlhšieho než 10 rokov, čiže pokrývajú značnú časť života človeka (Hedges et al. 2007). Využíva sa pritom kolagén tvoriaci fibrily, a to predovšetkým kolagén typu I, ktorý tvorí vyše 90 % organickej zložky kosti (Gelse 2003).

Kolagén v mladších, menej mineralizovaných kostiach, je viac rozpustný než starší kolagén, a preto môže ľahšie podliehať degradácii (Bell et al. 2001). Pri pracovaní s recentným materiálom sa musí dbať na správne odstránenie tuku a humických kyselín z kostného tkaniva,

¹ Osteologický paradox znamená, že kostry s vyšším počtom patologických nálezov nepatria nevyhnutne jedincom s horším zdravotným stavom ako kostry bez takýchto znakov. Lepší zdravotný stav vďaka kvalitnejšej strave je jedným z faktorov, ktoré pomáhajú predĺžiť život s ochorením, čím sa predlžuje čas, počas ktorého sa môžu patologické znaky na kostre vytvoriť a hromadiť (Wood et al. 1992). Vďaka lepšej výžive je preto človek postihnutý i vážnejším ochorením, schopný prežiť po dlhšiu dobu, ako človek s rovnakým zdravotným problémom, ale horším nutričným stavom.

nakoľko môžu ovplyvňovať výsledné hodnoty izotopov (Ambrose 1990). Pred samotnou extrakciou kolagénu sa prevádza dôkladné čistenie nadrveného kostného materiálu v roztoku metanolu a chloroformu (viď Metódy).

Riziko pre analýzu predstavujú diagenetické zmeny či kontaminácia pochovaných ľudských pozostatkov. Je dôležité vybrať vhodnú metódu extrakcie kolagénu zo vzoriek, vzhľadom na to, čo môže kostný materiál obsahovať a čím mohol byť kontaminovaný v mieste uloženia (van Klinken 1999). Kolagén môže byť vzhľadom na tieto faktory viac či menej degradovaný narušením peptidových väzieb medzi jednotlivými aminokyselinami (Collins et al. 2002). Jeho zloženie a zachovalosť môžu ohroziť i pôdne mikróby (Nielsen Marsh & Hedges 2000).

4.2 Bioapatit

Anorganickú zložku kostného tkaniva, bioapatit, tvorí hydroxyapatit vápenatý spolu s rôznymi prímiesami, napríklad stroncia, bária či olova. Z tejto zložky sú rutinne analyzované izotopy uhlíka, kyslíka a stroncia ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ a $\delta^{87/86}\text{Sr}$). Pomocou izotopovej analýzy bioapatitu je možné skúmať celkovú výživu jedinca (informácie ako o proteínovej zložke stravy, tak o pôvode sacharidov a tukov v nej (Ambrose & Norr 1993)) i jeho rezidenčnú mobilitu (Gelse et al. 2003).

Bioapatit výrazne podlieha transformačným zánikovým zmenám vplyvom prostredia, kde bolo telo uložené. Minerálna zložka zubov je odolnejšia než u kostí, ale niektoré výskumy túto teóriu nepotvrdili a ukázali, že takisto týmto procesom podlieha. Naopak, prirodzené izotopy organickej zložky kostí, kolagénu, sa zdajú byť voči postdepozičným zmenám omnoho odolnejšie, a preto sú pri experimentoch uprednostňované. Ďalšou výhodou kolagénu oproti bioapatitu sú presne stanovené kritériá zachovalosti, medzi ktoré patria percentuálny výtlačok kolagénu, obsah uhlíku a dusíku a pomer C:N vo vzorke (Lee-Thorp 2008; Ambrose 1990; van Klinken 1999).

4.3 Nemineralizované tkanivá

Jednotlivé tkanivá sa medzi sebou líšia metabolickou aktivitou, a to aj v rámci jedného organizmu. Dôsledkom toho je odlišná premena stabilných izotopov (Tieszen et al. 1983; Hobson & Clark 1992). Každé tkanivo môže teda informovať o požitej strave z rôzne dlhých časových období, od niekoľkých dní až po desaťročia zo života organizmu. Stabilné izotopy v metabolicky veľmi aktívnych tkanivách či orgánoch, ako je pečeň, môžu odzrkadľovať

stravu, ktorú jedinec požil v predchádzajúcom týždni, svalové tkanivo informuje o strave z posledných 1-2 mesiacov (Tieszen et al. 1983; Hobson & Clark 1992; Roth & Hobson 2011). Menej aktívne mineralizované tkanivá, ako kosti a zuby informujú o strave v rádoch rokov, prípadne z obdobia rastu (Reitsema & Vercellotti 2012; Lee-Thorp 2008). Metabolicky neaktívne tkanivá, napríklad srst', perie či koža, nepodliehajú premene a odrážajú informácie o strave jedincov len z obmedzeného časového obdobia ich rastu (Tieszen & Boutton 1989).

Prevedenie analýzy stabilných izotopov historických a moderných vzoriek je odlišné. Pri použití kostných vzoriek osôb z prelomu 19.-20. storočia musíme zohľadniť aj zachovanie iných než mineralizovaných tkanív. Na kosti sa môžu zachovať zvyšky svalového či tukového tkaniva. V takom prípade sa musí kosť dôkladne očistiť od neželaných organických prímiesí. Lipidy na kosti môžu v konečnom dôsledku ovplyvniť výsledky izotopovej analýzy, pretože znižujú hladiny $\delta^{13}\text{C}$ vo vzorke o približne 1–2 ‰ (Doucette 2010; Ambrose 1990), a tak musia byť ešte pred začiatkom samotnej izotopovej analýzy z kosti odstránené. Izotopové hodnoty dusíka $\delta^{15}\text{N}$ lipidy neovplyvňujú (Mintenbeck 2008; Medeiros et al. 2015).

Výnimočne sa môžu mäkké a keratizované tkanivá, ako vlasy, nechty či koža, zachovať aj v archeologickom zázname (Lee-Thorp 2008; O'Connell et al. 2001; DeNiro & Epstein 1981). Vďaka vhodnému miestu uloženia tela či prevedeniu určitých pohrebných rituálov sa môžu mäkké tkanivá dochovať aj po niekoľko rokov (Schwarcz & Schoeninger, 1991; Macko et al. 1999). Pri výskumoch súčasných populácií, ich spôsobu života či výživy, ako aj vplyvu patologických faktorov na izotopové zloženie organizmu, môžu byť využité aj mäkké tkanivá (Schwarcz & Schoeninger 1991; Macko et al. 1999). Predovšetkým izotopové analýzy vlasov sú šikovným nástrojom pre určenie nutričného stavu organizmu. Ich pomerne rýchly rast (1 cm vlasu za 1 mesiac) umožňuje skúmať pomerne krátke časové obdobie so svojimi výkyvmi, a to v aktuálnej časovej postupnosti týchto udalostí. Úspešné pokusy boli zaznamenané na pacientkach trpiacich mentálnou anorexiou a bulímiou (Mekota et al. 2006). Mäkké a keratizované tkanivá sa vo výskumoch stravovania či patologických vplyvov na organizmus využívajú, lebo zaznamenávajú vo svojich izotopových hodnotách i krátkodobú zmenu vo výžive, ktorá sa v pomaly sa remodelujúcom kostnom tkaniva nestihne prejaviť (Hobson et al. 1993).

Vždy je však nutné zohľadniť materiál, na ktorom boli štúdie uskutočnené. Izotopové hodnoty uhlíka a dusíka v kostnom kolagéne zvieracích modelov sa líšia od hodnôt ľudských kolagénových vzoriek, a takisto sa líšia hodnoty a zmeny pomerov izotopov medzi jednotlivými tkanivami a orgánmi v tele človeka. Zmena izotopových pomerov je tiež závislá na čase a priestore (van Klinken et al. 2002).

5 Základné poznatky o metabolizme proteínov

Kedže v tejto práci boli použité výhradne kolagénové vzorky, je nevyhnutné poznať chemický princíp a metabolizmus kolagénu, jednak na úrovni aminokyselín (AK), z ktorých je zložený, a tiež na úrovni samotného proteínu.

Proteíny sú makromolekuly, pozostávajúce z jedného či viac reťazcov zvyškov AK. Každá AK obsahuje tri funkčné skupiny: aminoskupinu ($-NH_2$), karboxylovú skupinu ($-COOH$) a špecifický postranný reťazec, ktorý určuje konkrétnu AK. Zvyšok AK je časť makromolekuly, ktorá zostane po odstránení jedného atómu kyslíka a dvoch atómov vodíka (Welle 2012). Zvyšky sú navzájom prepojené peptidovými väzbami, ktoré sú veľmi stabilné a narušené môžu byť len špecifickými enzýmami či pri niektorých silných chemických reakciách. Zastávajú obrovské množstvo funkcií v organizmoch, ako napríklad replikácia DNA, transport molekúl, odpovedanie na stimuly či urýchľovanie metabolických reakcií, a sú tiež základnou stavebnou hmotou tkanív (Welle 2012).

Základné členenie AK je na esenciálne a neesenciálne (viď Tab. 5.1). Esenciálne AK si ľudské telo nedokáže samo syntetizovať a je odkázané na ich príjem buď zo zložiek stravy (z degradovaných proteínov), prípadne cieleným užívaním potravinových doplnkov. Neesenciálne AK si organizmus syntetizuje z metabolických prekursorov (Voet & Voet 1990; Schwarcz 1999). Existuje ešte špecifická skupina, a to podmienené esenciálne AK - arginín a histidín, ktoré sú esenciálne len za určitých podmienok. Telo si ich dokáže syntetizovať, avšak v nedostatočnom množstve a navyše môže byť táto schopnosť vplyvom rôznych faktorov obmedzená (ochorenie) alebo rýchlosť ich syntézy nie je dostatočná pre nároky organizmu (rast a vývoj v detstve). Je tak nevyhnutné, aby si telo doplnilo ich zásobu z potravy (Voet & Voet 1990; Reeds 2000).

Tab. 5.1: Rozdelenie aminokyselín (názov AK + skratka) na základe esenciality.

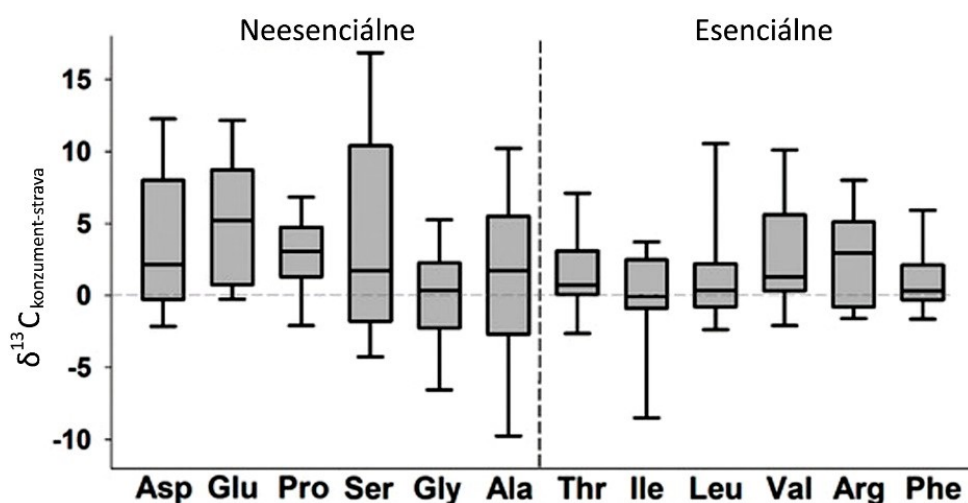
Esenciálne AK	Neesenciálne AK
Fenylalanín (Phe)	Alanín (Ala)
Izoleucín (Ile)	Cysteín (Cys)
Leucín (Leu)	Kyselina asparágová (Asp)
Lyzín (Lys)	Kyselina glutámová (Glu)
Metionín (Met)	Glycín (Gly)
Treonín (Thr)	Histidín (His)*
Tryptofán (Trp)	Asparagín (Asn)*
Valín (Val)	Prolín (Pro)
	Glutamín (Gln)
	Arginín (Arg)
	Serín (Ser)
	Tyrozín (Tyr)

*podmienene esenciálne AK

Biosyntéza esenciálnych a neesenciálnych AK je rôzna. Vznik neesenciálnych AK vychádza vždy zo štyroch bežných metabolických prekursorov, a to oxalacetátu $C_5H_6O_5$ (Asp, Asn), oxoglutarátu $C_4H_4O_5$ (Glu, Gln, Pro, Arg a His), pyruvátu $C_3H_4O_3$ (Ala) a 3-fosfoglycerátu $C_3H_7O_7P$ (Ser, Cys, Gly). Výnimku tvorí len Tyr, ktorý vzniká z Phe. Ich biosyntéza prebieha pomerne jednoducho. Vznik Ala, Asp a Glu prebieha jednoduchou transamináciou z ketokyselín pyruvátu a oxalacetátu a oxoglutarátu. Asn a Gln vznikajú následne amidáciou Asp a Glu. Glu je tiež prekursorom Pro a Arg. His má pomerne zložitejšiu biosyntézu, pričom 5 jeho uhlíkov je odvodených od fosforibozyl pyrofosfátu a 6. uhlík získava z ATP. Ser, Cys a Gly sú odvodené od 3-fosfoglycerátu. Ser vzniká v troch krokoch (fosforyláciou, transamináciou a hydrolýzou) a z neho odvodzujeme Gly a Cys (Voet & Voet 1990). Esenciálne AK sú, podobne ako neesenciálne AK, syntetizované z bežných biochemických intermediátorov, ich syntetické dráhy sú však väčšinou dlhšie a zložitejšie a nachádzajú sa výhradne v mikroorganizmoch a rastlinách (Voet & Voet 1990).

Esenciálne a neesenciálne skupiny AK sa od seba odlišujú aj svojím izotopovým zložením. Toto rozdelenie sa využíva hlavne v izotopovej analýze $\delta^{13}C$. Neesenciálne AK vznikajú v organizme jednak *de novo*, pričom pri svojej tvorbe využívajú uhlík i z nebielkovinových makromolekúl, lipidov a sacharidov, a tiež príjmom z potravy. Ak je v strave konzumenta dostatok neesenciálnych AK, sú využívané priamo, tak ako esenciálne AK, ak nie, narastá význam *de novo* syntézy. Kolagén je tvorený prevažne neesenciálnymi AK (vid' Kap. 5.1), ale $\frac{3}{4}$ jeho atómov uhlíka pochádzajú z potravných proteínov. Pokiaľ strava konzumenta neobsahuje dostatočné množstvo proteínov pre metabolické procesy tela, je využitie uhlíkových

zdrojov z ostatných zložiek potravy výraznejšie (Whiteman et al. 2019). Proteíny sú v porovnaní s ostatnými zložkami potravy bohatšie o izotop ^{13}C . Oproti sacharidom je tento rozdiel 4 ‰, oproti tukom asi 6 ‰. To znamená, že konzumenti, ktorých strava je zložená prevažne z proteínov, budú mať v tkanivách zvýšené hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ (Roth & Hobson 2000). Organizmus človeka nie je schopný syntetizovať esenciálne AK, sú preto prijímané výhradne z proteínovej zložky stravy (Whiteman et al. 2019). Esenciálne AK prechádzajú zo stravy do tkanív s veľmi malou mierou izotopovej frakcionizácie ($\sim 1\text{--}2$ ‰) bez ohľadu na zdroj potravy (Honch et al. 2012; Corr et al. 2005; Howland et al. 2003). Rozdiel izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ esenciálnych AK medzi stravou a tkanivami konzumenta je takmer nulový, u neesenciálnych AK má izotopový pomer $\delta^{13}\text{C}$ v tkanivách konzumenta väčšinou vyššie hodnoty ako v požívanej strave (viď Graf 5.1 (Whiteman et al. 2019)). Izotopové rozdiely $\delta^{13}\text{C}$ sú ovplyvnené celkovým zložením stravy či typom frakcionizácie. Ak sa izotopová hodnota $\delta^{13}\text{C}$ konzumenta blíži hodnotám v potravných zdrojoch, dôvodom je pravdepodobne vyšší podiel AK prijatých priamo zo stravy, ak sa hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ medzi konzumentom a zdrojom potravy výrazne odlišujú, znamená to vyšší podiel *de novo* nasyntetizovaných AK (Whiteman et al. 2019).



Graf 5.1: Rozdiel v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ (‰) medzi stravou a tkanivom konzumenta (upravené z Whiteman et al. 2019)

Ďalšie rozdelenie AK je na trofické a zdrojové. Na základe tejto klasifikácie sa medzi trofické AK radia Ile, Leu, Val, Ala, Asp, Glu a Pro a medzi zdrojové Phe, Lys, Met a Tyr. Zvyšné AK nie sú priradené ani do jednej kategórie (Whiteman et al. 2019). Toto rozdelenie sa využíva pri analýze izotopových pomerov dusíka $\delta^{15}\text{N}$, a to kvôli nestálosti dusíkového atómu v aminoskupine AK. Tento atóm môže byť nahradený v procese transaminácie. Atóm uhlíka

počas toho ostáva nezmenený. Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sa medzi skupinami AK odlišujú. Zdrojové AK sa typicky nezúčastňujú v procesoch deaminácie či transaminácie, preto ich hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ zostávajú medzi stravou a tkanivami konzumentom nezmenené, rozdiel izotopových hodnôt medzi nimi je takmer nulový. Trofické AK spravidla deaminácii a transaminácii podliehajú, čo má za následok obohatenie tkanív konzumenta o ťažší izotop ^{15}N , ľahší izotop ^{14}N je z tela prednostne vylučovaný. Tkanivá konzumenta majú vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ oproti požívanej strave. Rozdiel izotopových hodnôt dusíka medzi stravou a tkanivami konzumenta je asi 2-8 ‰ (Whiteman et al. 2019).

Aminokyselinové zloženie stravy i tkanív konzumentov je závislé na ich potravinovej stratégii. Strava bylinožravcov obvykle obsahuje adekvátne množstvo proteínu, aminokyselinové zloženie stravy však nemusí zodpovedať telesným potrebám zvieratá (Roth & Hobson 2000). Veľké množstvo požadovaných neesenciálnych AK si bylinožravce syntetizujú transamináciou zo sacharidov ich stravy (Krueger & Sullivan 1984). Strava mäsožravcov sa skladá hlavne z proteínov a tukov, požiadavky na AK pre rast a vývoj sú dostatočné zo stravy. Aminokyselinové zloženie v mäse je veľmi podobné zloženiu potrebnému pre rast organizmu. Výsledkom toho je, že sú biochemické procesy medzi potravným príjmom a výstavbou nových tkanív v telách bylinožravcov a mäsožravcov odlišné, rôzna je ich izotopová frakcionizácia (Roth & Hobson 2000). Človek je všežravec, jeho strava je zastúpená predovšetkým sacharidmi, ďalej tukmi a v najmenšom množstve proteínmi. Pomer nutričných zložiek v jeho strave musí byť vyvážený (Webb et al. 2016). Za normálnych podmienok je v kostnom kolagéne relatívne ustálený príspevok uhlíka z jednotlivých makronutrientov. Na izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ sa $\frac{3}{4}$ podieľajú proteíny, a zvyšnou $\frac{1}{4}$ tuky a sacharidy (Jim et al. 2006; Fernandes et al. 2012). Ak je množstvo proteínu v strave nedostatočné (menej než 20 %) alebo je telo vystavené stresu či ochoreniu, ktoré zvyšujú proteínový úbytok, zdrojom uhlíka pre výstavbu a regeneráciu tkanív sa stávajú nebielkovinové zložky stravy, lipidy a sacharidy. Tie sa pri nedostatku proteínov môžu podieľať na izotopovom zložení tkanív vo väčšej miere (napr. kolagénu (Howland et al. 2003)). Pri vystavení sa stresovým faktorom, narušení a regenerácii tkaniva dochádza k izotopovej frakcionizácii, asociovej s opakovaním procesov transaminácie a deaminácie, čo vedie k vyšším hodnotám $\delta^{15}\text{N}$ v tkanivách jedinca vystaveného stresovým vplyvom (viď Kap. 6 (Gannes et al. 1997)).

5.1 Zastúpenie aminokyselín v kolagéne

Kolagén je bielkovina zložená prevažne z aminokyseliny Gly (~26 %), ďalšie pomerne vysoko zastúpené AK sú Arg, Pro, Ala či hydroxyprolín (~ 15 % a menej). Pre kolagén je v primárnej štruktúre typická trojpeptidová repetícia Gly-X-Y, kde je hodnota X často zastúpená prolínom a Y hydroxyprolínom. Táto repetícia umožňuje sformovanie typickej triple-helikálnej domény, kde tri ľavotočivé vlákna spoločne vytvoria pravotočivú šroubovicu s molekulami Gly uprostred (Gelse 2003; van der Rest & Garrone 1991). Skupiny kolagénov sa navzájom odlišujú stavbou primárnych α reťazcov a ich kombináciou v triple-helixe v jednotlivých tkanivách, a to na kolagény tvoriace fibrily (využívané v rekonštrukcii výživy), asociované s fibrilami, tvoriace siete a iné (Gelse 2003; van der Rest & Garrone 1991).

V Tab. 5.2 sú zobrazené percentuálne hodnoty jednotlivých AK v kolagéne, ktoré sa na jeho zložení podieľajú minimálne 1 %. V zložení kolagénu prevládajú neesenciálne AK s približne 80 %, zvyšok je tvorený esenciálnymi AK prijímanými potravou (Eastoe 1955; Howland et al. 2003). Neesenciálne AK odzrkadľujú metabolizmus organizmu, nakoľko sa pri vystavení sa stresovým či patofyziologickým faktorom mení ich zdroj uhlíka. Namiesto z proteínov začnú pre svoju tvorbu využívať zásoby sacharidov a lipidov. Pokiaľ určitý stresor pôsobí na organizmus dlhodobo, predpokladá sa, že by mohol výrazne ovplyvniť aj izotopové hodnoty uhlíka v kolagéne (Howland et al. 2003).

Tab. 5.2: Aminokyselinové zloženie kolagénu a typ aminokyseliny spolu s príslušnými hodnotami v %, zoradené od najväčšieho podielu po najmenší

Aminokyselina	Typ aminokyseliny	Zastúpenie v kolagéne [%]
Glycín	neesenciálna	26,2
Arginín	neesenciálna	15,4
Prolín	neesenciálna	10,1
Alanín	neesenciálna	9,3
Hydroxyprolín	esenciálna	8,2
Kyselina glutámová	neesenciálna	5,9
Lyzín	esenciálna	4,59
Kyselina asparágová	neesenciálna	3,84
Serín	neesenciálna	2,94
Leucín	esenciálna	2,09
Valín	esenciálna	1,93
Treonín	esenciálna	1,5
Histidín	neesenciálna	1,41
Fenylalanín	esenciálna	1,15
Izoleucín	esenciálna	1,09
Hydroxylyzín	esenciálna	0,53
Metionín	esenciálna	0,43
Tyrozín	neesenciálna	0,36

5.2 Hormonálna regulácia proteínového metabolizmu

Tak ako väčšina metabolických procesov v ľudskom tele, aj metabolizmus proteínov je regulovaný hormónmi. Niektoré z nich, napríklad hormóny štítnej žľazy, u zdravého a správne sa vyživujúceho jedinca počas dňa nekolísajú, ale ich prítomnosť je nevyhnutná pre udržanie normálnych hodnôt zmeny proteínov. Ostatné hormóny, ako inzulín, počas dňa výrazne varírujú a ich funkcia spočíva v akútnej regulácii metabolizmu. Hormóny, ktoré sa označujú ako anabolické, majú tendenciu zvyšovať celkové množstvo proteínov v tele. Patrí k nim inzulín, rastový hormón či testosterón. Naopak, medzi katabolické hormóny, ktoré celkové množstvo proteínu znižujú, sa radia hormóny štítnej žľazy, kortizol alebo glukagón. Normálne hladiny katabolických hormónov väčšinou zodpovedajú za udržanie normálnych hodnôt zmeny proteínov. Ich znížené hladiny môžu mať za následok negatívne fyziologické následky, ktoré ovplyvňujú stravovanie pacientov (Welle 2012):

- hormóny štítnej žľazy (tyroxín a trijódtyronín) – celkové spomalenie metabolizmu (hlavné metabolické hormóny v tele),
- glukagón – hypoglykémia (znížená hladina glukózy v krvi),
- kortizol – hypoglykémia a poruchy gastrointestinálneho traktu.

Príliš vysoké koncentrácie anabolických hormónov môžu mať taktiež nepriaznivé následky, ktoré majú efekt aj na kostné tkanivo človeka (Welle 2012):

- rastový hormón – sklony k osteoartritíde,
- inzulín – hypoglykémia,
- testosterón – úbytok kostného tkaniva.

6 Pozitívna a negatívna dusíková bilancia

Dusíková bilancia je rozdiel medzi množstvom prijatého dusíka v potrave a množstvom vylúčeného dusíka močom a stolicou, hlavne vo forme močoviny. Narušenie metabolickej rovnováhy pôsobením hormónov privádza organizmus do anabolického či katabolického stavu (Welle 2012). Fyziologické i patologické vplyvy, ako rast a vývoj, tehotenstvo, či choroba, úrazové zranenie, hladovanie atď., môžu spôsobiť zmeny v metabolizme dusíka, a tým aj v izotopovom zložení tkanív (Fuller et al. 2004, 2005; Hobson et al. 1993; Mekota et al. 2006; Olsen et al. 2014; Schwarcz et al. 1999; White & Armelagos 1997).

Anabolizmus je charakterizovaný výstavbou nových tkanív pomocou látok prijatých z prostredia. Zdrojom dusíka sú predovšetkým proteíny. Pokiaľ telo prijme stravou viac dusíka ako nakoniec vylúči, dostáva sa do stavu pozitívnej dusíkovej bilancie. Tá nastáva v tele človeka v období rastu a vývoja, tehotenstva či počas reparácie tkanív, ale tiež z patofyziologických príčin. Telo vtedy zadržiava dusík (v podobe izotopov ^{14}N i ^{15}N), ktorý je potrebný pre stavbu, rast a vývoj alebo reparáciu tkanív a orgánov. Veľká časť AK z potravných proteínov je využitá k výstavbe nových tkanív priamo, bez procesu transaminácie alebo deaminácie. Organizmus vtedy zakomponováva do tkanív aj ľahší izotop ^{14}N , ktorý býva inak prednostne vylúčený (Waters-Rist & Katzenberg 2010), čo vedie k zníženiu hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ (Reitsema 2013; Fuller et al. 2004; Welle 1999). Pozitívna dusíková bilancia sa vyznačuje prevahou proteosyntézy nad rozpadom proteínov (Welle 2012). Vysoký príjem proteínov tiež ovplyvňuje dusíkovú rovnováhu organizmu. Čím vyšší podiel proteínov v strave, tým je dusíková rovnováha viac pozitívna. Nadmerné množstvo proteínov neznamena pre telo väčšinou tak závažný problém, ako ich nedostatok. Takýto stav nemusí byť nutne spojený so vznikom patológie (s výnimkou ochorení obličiek alebo fenylketonúrie (Welle 2012)).

V období neprospievania, napríklad pri vystavení tela fyzickému či emocionálnemu stresu, v období hladovania a poruchách príjmu potravy či rôznych chronických ochoreniach, dochádza k negatívnej dusíkovej bilancii (Hobson et al. 1993; Mekota et al. 2006; Olsen et al. 2014; Schwarcz et al. 1999; White & Armelagos 1997). Telo je v katabolickom stave, vyčerpáva vlastné zásoby dusíka a jeho príjem zo stravy je nedostatočný. To môže viesť k poruchám v základných fyziologických procesoch, ako je reparácia buniek a tkanív alebo proteosyntéza (Hobson et al., 1993; Katzenberg & Lovell, 1999; Reitsema 2013). Človek v negatívnej dusíkovej rovnováhe stráca následkom pôsobenia stresových faktorov časť tkaniva, počas katabolizmu sa degraduje svalové tkanivo (kachexia) a proteosyntéza prebieha

v iných tkanivách. Kachexia je stav organizmu charakterizovaný výrazným úbytkom na váhe atrofiou svalového tkaniva, slabosťou a výraznou stratou chuti do jedla. Príčinou tohto stavu je zvýšená proteolýza bielkovín. Pri narušení tkaniva a jeho následnej regenerácii nastáva opätovne izotopová frakcionizácia (opakovanie procesu transaminácie a deaminácie), ktorá vedie k zvýšeniu $\delta^{15}\text{N}$ (Gannes et al. 1997). U ľudí vystavených patofyziologickým vplyvom boli pozorované vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ ako u zdravých jedincov. Niektoré výskumy poukazujú na hranicu, ktorú musí organizmus vystavený stresu prekonať, aby sa jeho stav odzrkadlil na izotopových hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ (Hatch 2012; Reitsema 2013). Ak nie je organizmus pod značným a dlhodobým stresom, jeho efekt nie je izotopovou analýzou zachytiteľný (Hatch 2012; Reitsema 2013). Negatívna dusíková bilancia je ovplyvnená aj na hormonálnej úrovni, v stresovom období sú do tela uvoľňované adrenálne kortikosteroidy, ako kortizol, ktoré zvyšujú proteolýzu i premenu aminokyselín na glukózu (Welle 2012; Gelfand 1984).

Izotopové hodnoty uhlíka môžu takisto podliehať vplyvom nedostatku proteínov v strave či následkom určitého ochorenia zmenám. Pri dlhodobom neadekvátnom množstve prijímaných proteínov či ich príliš veľkého vylučovania z organizmu, bývajú izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ znížené (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013; Salesse et al. 2019 in press). Typickou stresovou zmenou izotopových hodnôt je teda kombinácia zvýšených hodnôt stabilného izotopu dusíka (stav negatívnej dusíkovej bilancie), a zároveň znížených hodnôt uhlíka (vyšší podiel nebielkovinových potravných zdrojov).

6.1 Stav pozitívnej dusíkovej rovnováhy

6.1.1 Tehotenstvo

Počas tehotenstva je telo ženy v stave anabolickom, vstupuje do pozitívnej dusíkovej rovnováhy, a tým sa zníži vylúčenie dusíka z tela močom a zvýši sa proteosyntéza kvôli potrebám rastu plodu. Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sú znížené, telo dusík prijíma zo stravy, a zároveň prirodzene zadržiava jeho vylúčenie (Fuller 2004; D'Ortenzio et al. 2015). Tehotenstvo charakterizuje syntéza proteínov matky i plodu, ktorá sa začína zvyšovať počas druhého trimestra, k najvýraznejšej zmene dochádza až v posledných troch mesiacoch tehotenstva (Fuller et al. 2004).

V štúdií Fuller et al. (2004) na vlasových vzorkách, boli sledované skupiny žien s rôznou stravou počas tehotenstva. Niektoré ženy príjem živočíšnych bielkovín zvýšili, iné ho nezmenili či naopak znížili. V izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ neboli zaznamenané žiadne zmeny

medzi časom počatia a pôrodu. Avšak, v prípade $\delta^{15}\text{N}$ dochádza počas tehotenstva k jeho výraznému poklesu, medzi časom počatia a pôrodu bol rozdiel 0,6-1 ‰ (Fuller 2004; D'Ortenzio et al. 2015).

V kostnom kolagéne žien bol taktiež zaznamenaný vplyv tehotenstva na zmeny izotopových hodnôt. Využité boli vzorky rebier, čiže kostí s rýchlejšou obmenou kostného tkaniva (Nitsch et al. 2010). Zohľadnený bol aj počet tehotenstiev ženy a doba, ktorá uplynula v živote ženy od posledného pôrodu. V prípade, že žena rodila niekoľkokrát počas života a zároveň umrela v rámci piatich rokov od posledného pôrodu, boli izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom zázname znížené, pretože kostné tkanivo rebra sa ešte nestačilo úplne obmeniť, ale vplyv tehotenstva v ňom stihol byť zapísaný a v čase smrti bola táto izotopová zmena stále zaznamenaná (Nitsch et al. 2010). Vzhľadom na to, že v našej vzorke sa nachádzajú ženy, ktorých rozmedzie medzi posledným pôrodom a smrťou je od 9-60 rokov, je pravdepodobné, že sa analýzou na rebre izotopové zmeny počas tehotenstva nepreukážu. Z tohto dôvodu sme pre výskum vplyvu tehotenstva použili ako rebro, tak i stehennú kosť. V stehennej kosti by signál z obdobia tehotenstva mohol byť uložený (Hedges et al. 2007), nutné je však zohľadniť aj počet tehotenstiev, a teda, akú veľkú časť obdobia dospelosti bola žena tehotná. Preto by mali v stehenných kostiach izotopové zmeny korelovať skôr s počtom pôrodov než s počtom rokov od posledného pôrodu.

6.2 Stav negatívnej dusíkovej rovnováhy

6.2.1 Nutričný stres

Nedostatočná či nutrične neadekvátne strava ovplyvňuje izotopové hodnoty. Jedinci môžu byť vystavení nutričnému stresu priamo, napríklad pri poruchách príjmu potravy (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006) či nedostatku kvalitnej stravy v ich okolí. Nutričný stres je aj sprievodným faktorom mnohých ochorení (Katzenberg & Lovell 1999; Mekota et al. 2006). Za vznikom nutričnej nedostatočnosti organizmu môžu stáť rôzne mechanizmy, či už nechutenstvo, poruchy vstrebávania živín, metabolické či chronické ochorenia (Welle 2012).

Vplyv nutričného stresu bol skúmaný na pacientkach s poruchami príjmu potravy či tehotných ženách s rannou nevoľnosťou, ktorá vedie k malnutícii organizmu. Pacientkam s poruchami príjmu potravy boli odobraté vlasové vzorky a porovnané so zdravými kontrolami. V patologických vzorkách boli oproti zdravým kontrolám vždy hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ zvýšené a hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ znížené (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013). Telo

pacientiek, ktoré počas tehotenstva trpia rannou nevoľnosťou, je takisto v stave nutričného stresu. Nedochádza k požadovaného prísunu proteínov, telo ženy prechádza k využívaniu vlastných telesných zásob dusíka z tkanív. Najväčším rezervoárom dusíka v tele je svalové tkanivo, kde dochádza k uvoľňovaniu dusíka a k proteosyntéze za účelom výživy plodu (Fuller et al. 2005; D'Ortenzio et al. 2015). Izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sa preto v telách tehotných žien vystavených nutričnému stresu zvyšujú (Fuller et al. 2005).

Výskumy vplyvu nutričného stresu na izotopové hodnoty uhlíka a dusíka boli doposiaľ uskutočňované predovšetkým na mäkkých a keratizovaných tkanivách zvierat (Hobson et al. 1993) alebo ľudí (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006).

7 Izotopová analýza patologického kostného tkaniva

V súčasnosti stále nie je úplne objasnené, akým spôsobom patofyziologické faktory ovplyvňujú izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ kostného kolagénu. Kostné tkanivo remodeluje oproti mäkkým tkanivám oveľa pomalšie, odzrkadľuje tak izotopový priemer za veľmi dlhé obdobie života organizmu a ťažko sa v ňom zaznamenajú rýchle a krátkodobé zmeny (Tieszen et al. 1983; Hobson & Clark 1992; Roth & Hobson 2011; Reitsema & Vercellotti 2012; Lee-Thorp 2008). Zmeny organizmu, napríklad počas tehotenstva alebo pri akútnom ochorení, sa nemusia prejavovať aj zmenami pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ alebo sa prejavujú len veľmi nenápadnou zmenou, ktorá môže byť bez poznania patologického stavu daného organizmu, považovaná za normálnu variabilitu v izotopových hodnotách. Preto je dôležité sledovať kostný materiál s doloženými patológiami jedinca, najlepšie na základe zdravotnej dokumentácie či pitevných protokolov. Takýchto možností je pomerne málo, a preto je štúdií zaoberajúcimi sa izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ patologického kostného tkaniva doposiaľ minimum (Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). Predkladaná diplomová práca je jednou z nich.

Táto kapitola je venovaná stručným opisom vybraných patologických stavov, u ktorých bol preukázaný vplyv na metabolizmus proteínov alebo priamo na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ alebo $\delta^{15}\text{N}$ ľudských tkanív (White & Armelagos 1997; Katzenberg & Lovell 1999; Fuller et al. 2005; Mekota et al. 2006; Salesse et al. 2019 in press), a ktoré sa zároveň vyskytujú u študovaného súboru jedincov diplomovej práce.

7.1 Ochorenia kostí

V doterajších štúdiách bol skúmaný predovšetkým vplyv patológií s kostným prejavom na pomery stabilných izotopov $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom tkanive (Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). Izotopové analýzy boli uskutočnené na kostiach postihnutých ochoreniami, ako atrofia, nešpecifickými (aktívna periostitída a liečená osteomyelitída) a špecifickými zápalmi (syfilis), či metabolickým ochorením (osteomalácia). Vzorky patologických kostí zvyčajne vykazujú normálnu variabilitu v porovnaní s hodnotami v zdravom kostnom tkanive rovnakého jedinca. Najvýraznejšie zmeny boli zaznamenané v kosti s osteomyelitídou, tento jedinec však navyše trpel ochorením AIDS. Patologický segment tkaniva vykazoval približne 2 ‰ zvýšenie $\delta^{15}\text{N}$ oproti ostatným normálnym segmentom z rovnakého jedinca. Nárast dusíkových hodnôt vznikol pravdepodobne následkom znovutvorby kolagénu z telesných proteínov katabolickými procesmi (Katzenberg & Lovell 1999). Iné výskumy s osteomyelitickými kosťami nepreukázali výrazne rozdielne izotopové

hodnoty, avšak mierne zvýšenie v izotopových pomeroch uhlíka aj dusíka bolo pozorované, čo naznačuje vplyv patológií s kostným prejavom na izotopové hodnoty (Olsen et al. 2014). Ďalším nešpecifickým zápalom postihujúcim kosti je periostitída, ktorá sa prejavuje horúčkovitými zápalmi periostia. V kolagéne takýchto kostí bolo takisto zaznamenané mierne zvýšenie, ale len v izotopoch dusíka (Olsen et al. 2014). Metabolické zmeny spôsobené infekčnými ochoreniami sú podobné zmenám v kostiach s fyzickými zraneniami. Pri vážnych či dlhotrvajúcich infekciách nedokáže proteín zo stravy dostatočne nahradiť dusíkové straty v kostnom kolagéne (Welle 1999; Olsen et al. 2014). Osteomalácia je metabolické ochorenie dospelých zapríčinené nedostatkom vitamínu D, čo vedie k nesprávnej mineralizácii v kosti, remodelácia kosti je zvýšená a telo pacienta je v stave negatívnej dusíkovej rovnováhy. Nedostatok vitamínu D postihuje rovnomerne celý skelet, preto sa zmena izotopových pomerov medzi jednotlivými kosťami rovnakého jedinca nelíši, a toto ochorenie nemá pozorovateľný efekt na izotopové pomery uhlíka ani dusíka (Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). To však nevylučuje, že vplyv môže byť zaznamenaný v inom typ kosti jedinca.

7.2 Zranenie

Pacienti uzdravujúci sa z nejakého zranenia či po chirurgickom zákroku sú typicky v katabolickom stave. Majú zvýšené hodnoty katabolických hormónov (kortizolu, glukagónu či cytokínu TNF- α), ale tiež znížený potravný príjem a dlhodobý odpočinok na lôžku (Welle 2012). Pri vážnejšom zranení či popáleninách je negatívna dusíková rovnováha vyvažovaná zvýšením celotelovej proteolýzy. Protoesyntéza sa zvyšuje tiež, avšak menej, dochádza tak k strate niektorých telesných bielkovín. Produkujú sa proteíny nevyhnutné pri strate veľkého množstva krvi a hojení tkanív, preto je proteosyntéza napr. svalového tkaniva utlmená (Welle 2012; Olsen et al. 2014).

Pri kostných fraktúrach je doba hojenia približne 6-8 týždňov, v závislosti na kosti. Izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sú počas tohto obdobia typicky zvýšené v celom organizme, avšak je nutné zohľadniť fakt, že hodnoty v novo vytvorených kostných trámčekov budú mať výrazne vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ než nepatologická kosť, ktorá udáva dlhodobý priemer izotopových hodnôt organizmu (Olsen et al. 2014; Sfeir et al. 2005; Katzenberg & Lovell 1999). Je možné, že jedinci v študovanom súbore, ktorí krátko pred smrťou prekonalí chirurgický zákrok, zranenie či autonehodu, budú vykazovať zvýšené izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$.

7.3 Rakovina

Rakovina je jedným z ochorení, ktoré v dôsledku výraznej straty telesných proteínov privádzajú organizmus do stavu kachexie. Primárnym faktorom je nedostatočná výživa organizmu. Je nevyhnutné zohľadniť aj iné vplyvy, ktoré môžu mať efekt na spojenie rakoviny a metabolizmu proteínov. Medzi tieto faktory patria zvýšené hladiny cytokínov a ostatných katabolických hormónov, následky chemoterapie, podstupenej operácie na odstránenie nádoru a s ňou súvisiacimi procedúrami a liečbou, a takisto proteínový metabolizmus samotného nádoru (aj keď tento vplyv býva kvôli veľmi malému podielu bunkovej hmoty nádoru, menej než 1 % na celkovej hmote organizmu, zanedbávaný). Všetky tieto vplyvy sa medzi pacientami môžu líšiť, vplyv rakoviny samej o sebe na metabolizmus proteínov je veľmi ťažké definovať. Je to ochorenie asociované so zvýšenou výmenou (proteolýzy a následnej proteosyntézy) proteínov v celom tele, čím sa môže skrátiť doba, z ktorej pochádza izotopový signál v kosti jedinca. Najväčšia strata proteínov pochádza z tukového a svalového tkaniva, nie všetky výskumy však pozorovali zmenu kompozície tela medzi onkologickými pacientami a zdravými kontrolami (Welle 2012). Jedinci nášho súboru, ktorí počas života prekonali alebo podľahli onkologickému ochoreniu, by pravdepodobne mali vykazovať zvýšené hodnoty $\delta^{15}\text{N}$. Ak bol rakovinou zasiahnutý orgán tráviacej sústavy, mohol byť obmedzený aj výživový príjem jedinca, čo môže viesť k zníženiu hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ v organizme.

7.4 Diabetes mellitus 2. typu a obezita

Diabetes mellitus (DM) 2. typu je na inzulíne nezávislý diabetes. Jedná sa o častejšiu formu cukrovky (9 z 10 prípadov) ako je DM 1. typu, ktorý je asociovaný s náhlou stratou telesnej hmoty a proteínov (Welle 2012). Diabetes mellitus 2. typu je naopak, často spájaný s obezitou. Vplyv obezity na metabolizmus proteínov je značný. Telesný nárast u obéznych osôb je spôsobený nielen zvýšeným príjmom tukov, ale aj bielkovín. Premena proteínov u obéznych osôb je rýchlejšia, zvýšená je ich proteolýza (Welle & Nair 1990; Welle 2012). Jedným faktorom, ktorý môže viesť k zvýšeniu tejto premeny je vyššia frakcionizácia rozkladu proteínov tukového tkaniva. Ďalším možným vplyvom je inzulínová rezistencia, ktorá spolu s vysokým obsahom cukru v krvi, vedie k prepuknutiu metabolického ochorenia, akým je DM 2. typu (Češka 2004).

Výskumy zamerané na zmenu metabolizmu bielkovín diabetikov oproti zdravým kontrolám pozorovali odlišné výsledky. Práca Welle & Nair (1990) ukázala, že medzi pacientami a kontrolami s rovnakou váhou, neboli preukázané signifikantné rozdiely medzi

výmenou telesných proteínov. Pri liečbe pacientov znižovaním glukózy v krvi sa rýchlosť celkovej výmeny bielkovín nezmenila (Welle & Nair 1990; Welle 2012). V iných výskumov bolo pozorované, že zvýšením hladín inzulínu a AK pomocou stravy možno znížiť celkovú proteolýzu v tele na hodnoty podobné nediabetickým pacientom (Denne et al. 1995). Štúdie, ktoré aplikovali v liečbe obéznych pacientov s DM 2. typu Gly, zaznamenali výrazné zrýchlenie celkovej výmeny proteínov oproti nediabetickým obéznym pacientom, rýchlejšia bola ako proteolýza, tak i proteosyntéza (Gougeon et al. 1997; Welle 2012). Na základe rôznych záverov predchádzajúcich štúdií sa bude sledovať zmena izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne diabetických pacientov zo súboru tejto práce.

7.5 Srdcové vady

Pre pacientov s chronickým ochorením srdca, kedy srdce nie je schopné pokryť metabolické potreby tkanív, je typická atrofia svalstva, stav sa označuje ako kardiatická kachexia (Mancini et al. 1992; Welle 2012). Znížený príjem stravy a telesná aktivita spolu s hormonálnymi zmenami (nárast TNF- α a kortizolu) u takýchto pacientov vedú k strate svalovej proteínovej hmoty. Väčšinou sa u nich prejaví zvýšená proteolýza v myofibrilách, proteosyntéza je redukovaná (Morrison et al. 1988). Jedinci z nášho súboru, ktorí trpeli určitým srdcovo-cievnyim ochorením môžu vykazovať zníženie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ (vplyvom nutričného stresu počas ochorenia) a naopak, zvýšenie $\delta^{15}\text{N}$.

7.6 Reumatoidná artritída

Pacienti s reumatoidnou artritídou sú v katabolickom stave, dochádza k redukcii množstva bunkovej hmoty a svalových proteínov. Strata svalového tkaniva môže súvisieť buď s inaktivitou, alebo so zvýšenými cytokínmi v tele následkom biologickej (glukokortikoidnej) liečby (Gibson et al. 1991; Roubenoff et al. 1994; Welle 2012). Vo výskume diplomovej práce sú jedinci, ktorí trpeli reumatoidnou artritídou, a preto sa v ich izotopových hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ môže očakávať zvýšenie.

7.7 Infekcia

Rôzne typy infekcií bývajú často spájané s hospitalizáciou, či dlhodobým pobytom na lôžku. Následkom toho je aj znížený príjem potravy, ktorý spolu so zvýšenou inaktivitou má katabolický efekt. Čím tento stav trvá dlhšie, tým je čerpanie proteínov väčšie, zvyšuje sa vylučovanie moču, a tým aj exkrécia dusíka. Strata proteínov môže byť 5-15 % z celkovej telesnej proteínovej hmoty (Welle 2012). Zvyšuje sa proteolýza aj proteosyntéza, pričom rozklad

proteínov prevažuje. Horúčka, ktorá infekčné ochorenia pravidelne sprevádza, má katabolický vplyv na svalové proteíny (Welle 2012; Baracos et al. 1984). V diplomovej práci je niekoľko jedincov, ktorí počas posledných rokov života či tesne pred smrťou trpeli nejakým infekčným ochorením (tuberkulóza, zápal pľúc, bronchitída), ktoré by mohlo viesť z vyšším hodnotám $\delta^{15}\text{N}$ v ich kostnom kolagéne.

7.8 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je závažné infekčné ochorenie, ktorého pôvodcom je baktéria *Mycobacterium tuberculosis*. Primárne postihnutý orgán sú pľúca. Šírením sa ochorenie dostáva do ostatných orgánov, medzi inými aj do orgánov tráviacej sústavy či kostí a kĺbových spojení, kde zasahuje prevažne dlhé kosti a chrbticu. Neliečením choroby vznikajú na kostiach deformácie, neskôr telo postihuje silná horúčka a výrazná strata hmotnosti, ktorá vedie k celkovému úbytku telesných bielkovín. Pokiaľ ochorenia zasiahne orgány tráviacej sústavy, má priamy vplyv na výživu jedinca. Najčastejšími symptómami sú vtedy bolesti brucha či hnačky, kedy telo pacienta prichádza o veľké množstvo živín (Povýšil & Šteiner 2007). Efekt tuberkulózy by sa mohol prejaviť aj v našom súbore jedincov. Poruchou vnútorných orgánov dýchacej a tráviacej sústavy je obmedzený výživový príjem, ktorý by mohol u jedincov s TBC viesť k zníženiu izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a zvýšeniu hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ oproti ostatným jedincom.

Zhrnutie vplyvu patológií na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$

Doterajšie výskumy závislosti izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na patofyziologických faktoroch využívali prevažne mäkké tkanivá človeka (White & Armelagos 1997; Fuller et al. 2005; Mekota et al. 2006). Štúdie došli k záverom, že väčšina ochorení má navzájom podobný vplyv na metabolizmus bielkovín v organizme. Telo chorého jedinca je v stave negatívnej dusíkovej rovnováhy, katabolický efekt vedie k zvýšenej exkrécii ľahšieho izotopu ^{14}N , čím sa zvyšujú konečné hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v tele chorého jedinca (Welle 2012). Patologický stav je často spojený s nutričným stresom, ktorý môže viesť k zníženiu izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a opäť k zvýšeniu pomerov $\delta^{15}\text{N}$ (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013). Dôvodom úbytku hmotnosti môže byť postihnutie orgánov tráviacej sústavy a veľké bolesti s tým spojené, alebo hospitalizácia a dlhodobý znížený príjem živín. Celková proteínová výmena v tele je zvýšená, primárne je urýchlený proces proteolýzy (často súvisí so stavom kachexie, ktorá sprevádza mnohé z vybraných ochorení), čím sa môže skrátiť doba, z ktorej pochádza izotopový signál choroby (Welle 2012). To môže znamenať, že izotopová zmena potrebuje kratší čas na zápis do tkanív. Patologický stav by sa tak mohol prejaviť nielen na izotopovom zložení tkanív

s rýchlou obmenou, ale aj pomaly remodelujúcom kostnom tkanive (Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). Štúdií, ktoré sú zamerané na vplyv patológií na izotopové pomery, a súčasne využívajú kostné tkanivo je minimum. Je potrebné rozšíriť oblasť výskumu aj o testovania na mineralizovaných tkanivách, ktoré sa dokážu po smrti jedinca zachovať oveľa dlhšiu dobu než mäkké tkanivá (Reitsema & Vercellotti 2012).

Predpokladom je, že jedinci, u ktorých bola na základe zdravotných záznamov doložená niektorá z vybraných patológií, by mohli mať vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ ako jedinci, ktorí umreli v mladom veku náhlou smrťou (autonehoda či násilná smrť zastrelením) alebo v ich zázname nebola žiadna z týchto patológií doložená a umreli náhle (Welle 2012; Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press). Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ by mohli byť následkom nutričného stresu počas choroby znížené (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013).

8 Environmentálne faktory

8.1 Vlhkosť

Izotopové hodnoty uhlíka i dusíka sa menia v čase a priestore a líšia sa v závislosti na vlastnostiach prostredia (van Klinken et al. 2002). Z faktorov ako teplota, vlhkosť, nadmorská výška, zemepisná šírka či zemepisná dĺžka, to je práve vlhkosť, ktorá preukazuje najsilnejší vplyv na izotopové hodnoty. V prostredí s vyššou vlhkosťou majú organizmy zápornejšie izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$, u rastlín na území Európy je tento posun 2-4 ‰ (van Klinken et al. 2002).

V teplom a aridnom prostredí sa niektoré organizmy môžu dostať do stavu tepelného stresu. Aby uchovali potrebnú vodu, sú schopné zvýšiť koncentráciu močoviny v moči i celkové množstvo vylučovaného moču. S väčším objemom vylúčeného moču, v ktorom sa prioritne vylučuje ^{14}N , sa v tele hromadí viac ťažšieho izotopu dusíka ^{15}N . Preto majú ich tkanivá zvýšený pomer $\delta^{15}\text{N}$ oproti organizmom žijúcim v chladnejšom a vlhšom prostredí (Ambrose 1990; Fraser et al. 2011; Heaton 1987). V našom súbore pochádzajúceho z 19.-21. storočia a z relatívne malého územia, nemožno predpokladať výrazné zmeny environmentálnych podmienok, ktoré by mali konečný vplyv na izotopové rozdiely uhlíka alebo dusíka medzi jedincami.

8.2 Hnojenie

Používanie živočíšnych hnojív má výrazný vplyv na dynamiku dusíka v životnom prostredí. Ľahší izotop ^{14}N sa odstraňuje z pôdy prednostne, ťažší izotop ^{15}N v nej ostáva a jeho množstvo sa kumuluje, čím sa zvyšujú izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$. Rastliny využívajú pôdne minerály ako zdroj živín (Fraser et al. 2011; Heaton 1987). V trofickom reťazci sa zvýšené izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ dostávajú až do tiel konzumentov, vrátane človeka (Schoeninger & DeNiro 1984; Bogaard et al. 2007; Fraser et al. 2011; Gröcke et al. 1997).

S nástupom priemyselného hnojenia a využívaním syntetických hnojív druhej polovice 19. storočia (prvá továreň na výrobu syntetických hnojív v Čechách bola uvedená do prevádzky v roku 1872 v Kolíne nad Labem (mechanizaceweb.cz 2018)), dochádza k postupnej zmene izotopových pomerov $\delta^{15}\text{N}$ (Bateman & Kelly 2007). Pôdy hnojené modernými hnojivami vykazujú menšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ než pôdy hnojené živočíšnymi hnojivami (Bateman & Kelly 2007). To môže následne ovplyvniť aj izotopové hodnoty v ďalších stupňoch trofických reťazcov. Prechod na priemyselný spôsob hnojenia syntetickými hnojivami predchádzal úmrtiu

všetkých jedincov v súbore, je však nutné zohľadniť postupnú zmenu tohto prechodu na území dnešnej Českej republiky. Spočiatku na nový spôsob hnojenia prechádzali hlavne veľkostatkári, roľnícki hospodári využívali starší typ hnojenia živočíšnymi hnojivami oveľa dlhšie, a postupne začali využívať i syntetické hnojivá (Jindra & Jakubec 2015; Bičík et al. 2015).

8.3 „The Suess effect“

Od priemyselnej revolúcie v 18.-19. storočí, množstvo fosílnych palív unikajúcich do ovzdušia enormne stúplo, čo zapríčinilo celkovú zmenu v pomere ťažších izotopov uhlíka (^{13}C a ^{14}C) v atmosfére. Spaľovaním fosílnych palív sa do ovzdušia uvoľňuje veľké množstvo CO_2 , ktoré obsahuje nízke hodnoty ^{13}C a neobsahuje ^{14}C . Preto môžu byť súčasne žijúce organizmy izotopovo odlišné od historických, z doby pred industrializáciou (Marino & McElroy 1991; Francey et al. 1999). Medzi súčasnými a archeologickými vzorkami rastlín a živočíchov nastal rozdiel, historické vzorky majú o približne 1,5 ‰ vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ oproti súčasným organizmom (Kellner & Schoeninger 2007). Tento jav musíme zohľadniť aj v našom súbore, ktorý na základe úmrtí jedincov pokrýva časové obdobie od roku 1888 až do roku 2006. Medzi vzorkami skôr a neskôr žijúcich jedincov môžu byť namerané odlišné izotopové hodnoty – historickejšie vzorky by mali obsahovať vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ako recentnejšie (Kellner & Schoeninger 2007; Marino & McElroy 1991; Francey et al. 1999).

9 Ciele práce a hypotézy

Cieľom tejto práce je izotopová analýza $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne rebier a stehenných kostí 49 jedincov so známou osteobiografickou dokumentáciou, posúdenie vplyvov biologických (vek, pohlavie), environmentálnych (obdobie úmrtia), kultúrnych (status, zamestnanie) a patologických faktorov na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ a následné využitie výsledkov pre štúdium minulých populácií.

Vďaka informáciám o:

- zdravotnom stave – ochorenia a zranenia prekonané počas života, chronické choroby, príčina úmrtia,
- výživovom stave na základe pitevných protokolov,
- počte pôrodov, veku ženy v čase pôrodov, pôrode dvojčiat či prípadnej neplodnosti,
- spôsobe života, zamestnaní a socioekonomickej situácii,
- počte jedincov a generácií v konkrétnej domácnosti,
- a životnom prostredí,

je nám umožnené zohľadniť výsledky izotopovej analýzy vzhľadom na tieto doložené informácie.

Pretože naša vzorka je vďaka zaisteniu rodných a úmrtných listov datovaná presne, vieme, že jedinci pochádzajú z obdobia 19. až 21. storočia. Najdávnejšie umretý jedinec umrel v roku 1888 (č. 40), zatiaľ čo najrecetnejšie žijúci jedinec umrel v roku 2006 (č. 21). Časové rozpätie na základe úmrtí jedincov je 118 rokov počas troch posledných storočí. Treba preto zohľadniť environmentálne zmeny, ktoré sa v tomto období udiali, a to predovšetkým veľký rozmach automobilového priemyslu, ktorý výrazne prispel k unikaniu veľkého množstva fosílnych palív do ovzdušia. Pomer ťažších izotopov uhlíka (^{13}C a ^{14}C) v atmosfére sa počas posledných storočí zásadne menil. Spaľovaním fosílnych palív sa do ovzdušia uvoľňuje veľké množstvo CO_2 , ktoré obsahuje nízke hodnoty ^{13}C a neobsahuje ^{14}C . Preto môžu byť medzi vzorkami skôr a neskôr narodených jedincov odlišné izotopové hodnoty. U historickejších vzoriek predpokladáme vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ako u recetnejších (Kellner & Schoeninger 2007; Marino & McElroy 1991; Francey et al. 1999).

S nástupom priemyselného hnojenia druhej polovici 19. storočia, dochádza k postupnej zmene izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ (Bateman & Kelly 2007). Pôdy hnojené modernými hnojivami

vykazujú menšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ než pôdy hnojené živočíšnymi hnojivami (Bateman & Kelly 2007). Nižšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sa môžu preukázať aj v neskôr žijúcich jedincoch z nášho súboru.

H1: Zmena environmentálnych podmienok a zvýšená industrializácia počas posledných troch storočí, a s tým spojená zmena pomeru izotopov uhlíka v atmosfére, vedie k izotopovým zmenám v kostnom kolagéne. Skôr žijúci jedinci majú odlišné hodnoty izotopov uhlíka (vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$) ako neskôr žijúci. Na základe zmeny typu hnojenia, môžu byť izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ u neskôr žijúcich jedincov nižšie než u skôr žijúcich.

K izotopovej analýze boli, pokiaľ to bolo možné, doložené dve kosti toho istého jedinca, rebro a stehenná kosť. Rôzne rýchla remodelácia týchto kostí môže pôsobením všetkých vyššie zmienených faktorov viesť k odlišným výsledným hodnotám izotopov uhlíka a dusíka v rôznych kostiach rovnakého jedinca. V kostnom kolagéne rebier sa predpokladá výraznejší prejav patológií, ktoré predchádzali smrti (Fahy et al. 2017; Hedges et al. 2007; Lamb et al. 2014).

H2: Hodnoty izotopov uhlíka a dusíka sú odlišné u rôzne rýchlo remodelujúcich kostí toho istého jedinca, konkrétne u rebra, kde sa predpokladá rýchlejšia obmena kostného kolagénu (5-10 rokov) a stehennej kosti, u ktorého obmena kolagénu výrazne presahuje 10 rokov. Z tohto dôvodu sa tiež predpokladajú variabilnejšie izotopové hodnoty medzi rebrami rôznych jedincov ako medzi stehennými kosťami rôznych jedincov.

V rámci študovaného súboru nenachádzame významné rozdiely v SES na úrovni jednotlivcov, preto je súbor rozdelený do šiestich rodín (viď kap. Materiál), ktoré sa od seba mierne odlišujú na základe ich SES. Socioekonomický status sa pritom v rade populácií odráža v kvalite stravy. Čo sa týka sledovaných parametrov pomocou izotopovej analýzy, jedná sa hlavne o podiel živočíšnych proteínov v strave. Jedinci z bohatšie vybavených hrobov mali vyšší prísun živočíšnych bielkovín v strave, čo sa odzrkadlilo na výsledných izotopových hodnotách zvýšeným pomerom $\delta^{15}\text{N}$ (van der Veen 2003; Vytlačil et al. 2018; Kaupová et al. 2018). V našom súbore jedincov z 19.-21. storočia predpokladáme, že rodiny s vyšším sociálnym statusom si mohli dovoliť pestrejšiu stravu s väčším podielom živočíšnych bielkovín.

H3: Šesť príbuzných rodín sa na základe rozdielov v sociálnom statuse môže odlišovať v izotopových hodnotách, pričom u rodín s vyšším sociálnym zabezpečením predpokladáme vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$.

Naša práca je zameraná predovšetkým na vzťah medzi izotopovými hodnotami a výskytom doložených patológií (TBC, DM 2. typu, rôzne typy karcinómov atď.) jedinca. Niektoré štúdie tieto spojitosti naznačujú, avšak boli vykonávané na veľmi malom súbore jedincov (Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press) či na vzorkách nemineralizovného tkaniva (White & Armelagos 1997; Fuller et al. 2005; Mekota et al. 2006). Pretože je náš súbor špecifický tým, že máme sprístupnené zdravotné záznamy každého jedinca, je možné konkrétne patológie spojiť s výsledkami izotopovej analýzy, a následne preukázať, či a ako zdravotný stav izotopové hodnoty ovplyvňuje. Vďaka úmrtným listom a niekoľkým pitevným protokolom poznáme príčinu úmrtia každého jedinca. Pri niektorých jedincoch je ako príčina smrti uvedené opotrebovanie organizmu, ktoré má súvis s vyšším vekom jedinca, kedy sa v tele hromadia patofyziologické faktory a senescenčné zmeny. Je teda dôležité, kedy tieto faktory začali v tele pôsobiť, nakoľko sa proces výmeny kostného kolagénu s vekom spomaľuje (Hedges et al. 2007). To všetko môže mať vplyv na izotopové hodnoty uhlíka a dusíka.

H4: Izotopové hodnoty môžu byť ovplyvnené zdravotným stavom jedinca, líšia sa medzi jedincami, ktorí trpeli chronickým ochorením a tými, ktorí umreli náhle. Vyšší vek súvisí s hromadením sa patofyziologických faktorov v tele a celkovým zhoršovaním sa zdravotného stavu. Vek dožitia má vplyv na hodnoty izotopov uhlíka a dusíka.

Počas tehotenstva je telo ženy v anaboličkom stave, vstupuje tak do stavu pozitívnej dusíkovej rovnováhy a dochádza tak k výraznému poklesu $\delta^{15}\text{N}$ (Fuller et al. 2004). To môže ovplyvniť celkový izotopový profil ženy. Štúdiá doteraz využívali prevažne keratizované tkanivá žien (Fuller 2004; D'Ortenzio et al. 2015), avšak výskum Nitsch et al. (2010) poukázal na znížené hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom tkanive žien, ktoré mali v doloženom zdravotnom zázname niekoľko pôrodov a súčasne umreli nie viac ako 5 rokov od posledného pôrodu.

H5: Počet pôrodov u ženy (**H5a**) a počet rokov od posledného pôrodu do úmrtia (**H5b**) môže mať vplyv na výsledné hodnoty stabilných izotopov. V tele tehotných žien nastáva zníženie izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$, čo by mohlo mať v pomaly remodelujúcich tkanivách efekt na konečné výsledky tohto izotopu. Ženy s väčším počtom pôrodov a tie, ktoré umreli v malom rozmedzí (menej než 5 rokov) od posledného pôrodu, by mali mať izotopové hodnoty dusíka nižšie.

10 Materiál

Súbor kostného materiálu pre analýzu stabilných izotopov uhlíka a dusíka tvorilo 49 ľudských jedincov oboch pohlaví (30 mužov a 19 žien) a 8 zvierat prezentujúcich referenčnú vzorku z toho istého obdobia a regiónu.

10.1 Ľudské vzorky

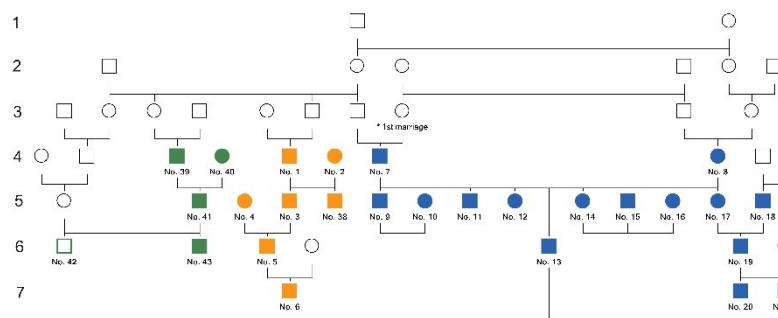
Vzorka ľudských jedincov bola genealogicky dokumentovaná. Tvorila ju členovia piatich odnoží jednej rodiny spolu s členmi jednej rodiny bez príbuzenských väzkov. Títo jedinci obývali rovnaké územie počas štyroch generácií v 19.-21. storočí. Časové vymedzenie súboru vzhľadom na rok narodenia je 1822-1943, vzhľadom na rok úmrtia je to 1888-2006.

Materiál bol exhumovaný z rodinných hrobiek z oblasti Stredočeského kraja, a to so súhlasom žijúcich pozostalých na výskum pozostatkov ich príbuzných. Detailná dokumentácia vznikla za pomoci aj týchto žijúcich príbuzných, a takisto vďaka poskytnutiu listín z matrik, radníc, nemocníc či iných inštitúcií. Identifikácia jedincov bola založená na dokumentácií od rodiny, cintorínu a na pozícii tiel v hrobke. Pre každú hrobku bol doložený zoznam pochovaných jedincov s kompletnými informáciami (Cvrček et al. 2018).

Kvôli zlej zachovalosti požadovaných kostí (rebra a stehennej kosti) boli zo súboru úplne vylúčení jedinci č. 29, 42, 44 a 45. Rebro ďalej nebolo doložené u vzoriek č. 4, 12, 14, 18, 26, 27, 32, 33, 39, 40, 41, 46 a 47. Stehenná kosť sa však u týchto jedincov zachovala a bola zaradená do výskumu. Konečný počet analyzovaných ľudských vzoriek bol teda 77 – 45 stehenných kostí a 32 rebier od 45-tich jedincov.

Rodinné vzťahy

Vzorku tvoria jedinci navzájom spojení príbuzenskými väzkami (viď Obr.10.1). V rámci týchto rodín bol zaznamenaný výskyt príbuzenských väzkov, niektorí jedinci sú dokonca potomkami dvojnásobne príbuzných rodičov (č. 9, 11, 12, 13, 14, 17, 42 a 43).



Obr. 10.1: Náhľad na rodokmeň študovaných jedincov, ktorí sú zvýraznení plnými bunkami (neštudovaní jedinci sú označení prázdnyimi bunkami). Jednotlivé rodiny sú farebne odlíšené, v rodokmeni chýbajú nepríbuzní jedinci č. 46-49 (upravené z Cvrček et al. 2018). Plná verzia obrázku je v Prílohe (Obr. 16.1) .

Kompletnú vzorku jedincov sme rozdelili na základe členov rodín (viď Tab. 10.1), ktorí spolu žili v rovnakej domácnosti, do šiestich vetiev (rodín). Päť z týchto rodín, je navzájom spojených príbuzenskými zväzkami, 6. rodina s nimi príbuzná nie je. Vzorka bola vymedzená na základe:

1. príbuznosti,
2. pobytu,
3. charakteru povolania.

Toto rozdelenie však nie je ostré, všetky rodiny sa navzájom viac či menej často stýkali, aj keď žili v oddelených domácnostiach, zdieľali spoločný priestor, a takisto boli medzi týmito jedincami príbuzenské manželstvá. Napríklad, jedinci č. 18-27 sú členovia 3. a 4. rodiny, žili oddelene, ale stretávali sa veľmi často a bol medzi nimi výrazný prekryv domácností. Jedinci č. 26 a 27 sú súčasťou 4. rodiny, s ostatnými členmi tejto rodiny zdieľali domácnosť väčšinu svojho života, avšak v starobe sa presťahovali do domácnosti k jedincom č. 19-21 (3. rodina).

Tab. 10.1: Rozdelenie kompletného súboru jedincov do jednotlivých rodín podľa zdieľaných domácností

1. rodina	2. rodina	3. rodina	4. rodina	5. rodina	6. rodina
39	1	7	22	28	46
40	2	8	23	29*	47
41	3	9	24	30	48
42*	4	10	25	31	49
43	5	11	26	32	
	6	12	27	33	
	38	13		34	
		14		35	
		15		36	
		16		37	
		17		44*	
		18		45*	
		19			
		20			
		21			

*jedinci, ktorí neboli zaradení do spracovávanej vzorky, nakoľko u nich nebola prítomná ani jedna z požadovaných kostí (rebro alebo stehenná kosť)

Socioekonomický status

Takmer všetci jedinci sa radia do strednej spoločenskej vrstvy, pričom najčastejším povoláním bol u mužov majster určitého spolku, sedliak, roľník či obchodník. Ženy sa väčšinou starali o chod domácnosti a výchovu detí. Informácie o sociálnom statuse a povolani jedincov sú spísané v Prílohe (Tab. 16.1).

Na základe rozdelenia vzoriek do jednotlivých rodín, vieme posúdiť aj SES každej z týchto rodín. 1. rodina bola s ostatnými rodinami v menšom kontakte, ako zvyšné rodiny medzi sebou navzájom. Odlišovala sa tiež nižším SES než všetky ostatné rodiny. Jej členovia boli predovšetkým roľníci. 2. a 3. rodina si boli navzájom veľmi podobné, obe rodiny vlastnili susedné statky, ale 3. rodina navyše vlastnila hostinec a traja jej členovia pôsobili ako regionálni politici. Tým sa líšila od 2. rodiny. Status 3. rodiny bol tak mierne vyšší než 2. rodiny. Socioekonomický status 2. až 6. rodiny bol však veľmi podobný.

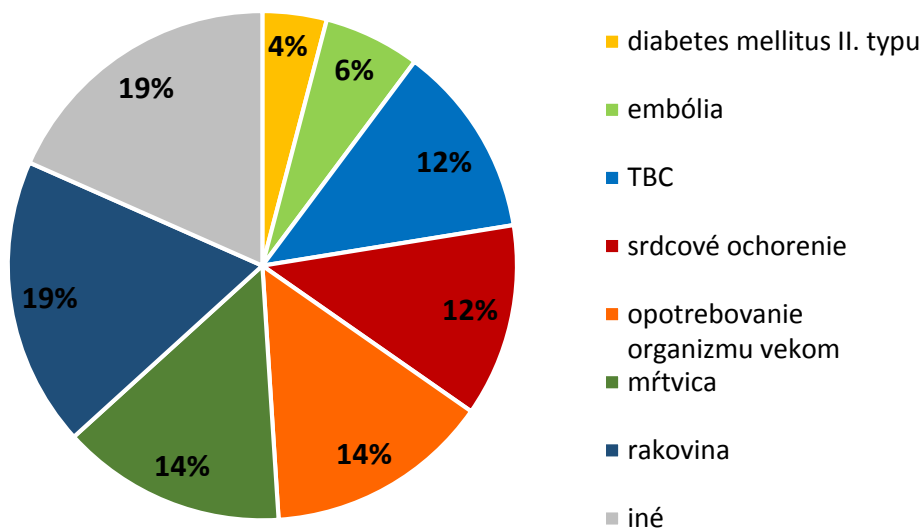
Vek dožitia a zdravotný stav

Vekové rozpätie jedincov v kompletnej vzorke je 14 dní až 90 rokov (viď Tab. 16.1 v Prílohe), v analyzovanej vzorke je to 20-90 rokov (najmladší analyzovaný jedinec je č. 43, najstarší sú jedinci č. 1 a 3). Výrazná časť jedincov vo vzorke sa dožila vysokého veku a príčinou ich úmrtia

bolo väčšinou opotrebovanie organizmu v súvislosti so senescenčnými a degradačnými procesmi. Ak by sme kompletnú vzorku rozdelili do troch vekových kategórií podľa antropologickej klasifikácie (Stloukal & Dobisíková 1999), počet vzoriek v skupinách by bol nasledovný:

- Adultus I a II (20-39 rokov) – 6 vzoriek,
- Maturus I a II (40-59 rokov) – 9 vzoriek,
- Senilis (60 rokov a viac) – 34 vzoriek.

Vzhľadom na dostupnú zdravotnú dokumentáciu každého z jedincov, poznáme konkrétne príčiny úmrtia (viď Tab.16.2 v Prílohe). Ako je spomenuté vyššie, väčšina jedincov sa dožila vysokého veku. Najčastejšou príčinou ich úmrtia (viď Graf 10.1) bolo karcinogénne ochorenia (19 %), ďalej mŕtvica (14 %), zlyhanie srdca (12 %) či tuberkulóza (12 %). Jedinci, ktorí počas života buď prekonal rakovinu alebo bola príčinou ich úmrtia sú č. 8, 16, 19, 22, 28, 34, 36, 37 a 44. Jeden jedinec umrel násilnou smrťou zastrelením vo veku 32 rokov (č. 5) a jeden jedinec umrel ako mladý počas autonehody, vo veku 22 rokov (č. 6). U jedincov č. 30 a 49 nie sú známe bližšie informácie o zdravotnom stave či príčine úmrtia.



Graf 10.1: Najčastejšie príčiny úmrtia v kompletnom súbore jedincov

Počet pôrodov u žien

Sledovaný bol aj počet pôrodov u 19 žien vo vzorke (viď Tab. 10.2 a Tab. 16.2 v Prílohe). Tri ženy umreli ako bezdetné, jedna z nich (č. 12) zomrela vo veku 29 rokov na mŕtvicu. Ďalšia žena (č. 16) umrela vo vyššom veku, ako 66-ročná. U poslednej ženy (č. 24) sa pri pitve zistil chýbajúci ľavý vaječník s vajcovodom. Dožila sa veku 82 rokov. Ostatné ženy vo vzorke rodili minimálne raz. Vzorky č. 27 a 37 porodili každá jedno dieťa, z toho žena č. 37 prekonala traumatický pôrod. Ôsmim ženám (č. 4, 10, 14, 17, 23, 28, 40 a 44) sa narodili 2-4 deti a piatim ženám (č. 2, 8, 31, 34 a 49) sa narodilo minimálne 5 detí, z toho dve ženy porodili dvojčatá – č. 31 porodila 7 detí, z toho boli dva páry dvojčiat, č. 49 mala detí 5, z toho 1 pár dvojčiat. Počet pôrodov ženy č. 47 nie je známy, vie sa však, že ich mala niekoľko, bližšie informácie nie sú dostupné. Vekové rozpätie žien počas pôrodov je 19-40 rokov. Najmladšie rodičky boli č. 2 a 8, najstaršou bola č. 17. Počet rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím žien je v rozmedzí 9-60 rokov.

Tab. 10.2: Kompletný súbor vzoriek žien spolu s počtom pôrodov a počtom rokov od posledného pôrodu

vzorka	počet pôrodov	počet rokov od posledného pôrodu
2	8	39
4	2	17
8	7	30
10	3	27
12	0	-
14	2	9
16	0	-
17	4	9
23	3	41
24	0	-
27	1	54
28	2	20
31	7	43
34	7	52
37	1	60
40	2	27
47	neznámy	-
49	5	50

Výživový stav

U ôsmich jedincov zo súboru bola uskutočnená zdravotná pitva a zaistený pitevný protokol, ktorý bol poskytnutý k štúdiu zdravotného a výživového stavu týchto jedincov. Na základe poskytnutých informácií vieme, či bola strava jedinca dostatočná alebo nie (viď Tab. 10.3).

Tab. 10.3: Jedinci, u ktorých bola uskutočnená zdravotná pitva, so stavom kostného a svalového tkaniva, výživovým stavom jedinca, ako aj chorobami, ktoré s ním súvisia

vzorka	výživový stav na základe pitevného protokolu
6	neudaný
9	jedinec silnej kostry a dobrej výživy, TBC pľúc, cirhóza a steatóza pečene
19	<i>habitus muscularis</i> a <i>obesitas</i> , jedinec silnej kostry a ochabnutého svalstva, podkožné väzivo s hojným tukovým tkanivom na bruchu (asi 3 cm)
21	kostra i svalstvo normálne vyvinuté, výživa skôr nadpriemerná, podkožný tuk na hrudníku 2 cm a na bruchu 6,5 cm
24	jedinec primeranej kostry a strednej výživy
38	jedinec silnej kostry, dobre vyvinutého svalstva a dobrej výživy
43	TBC v celom organizme, kachexia, obojstranne zdvojené obličky a degenerácia obličiek, nádor sleziny, dilatácia oboch srdcových komôr a degenerácia srdcového svalu, polyp v konečníku, ktorý spôsoboval zápchu
48	TBC pľúc, <i>kachexia gravis</i> (pokročilá), jedinec stredne silnej kostry a atrofovaného svalstva, medzirebrové priestory prepadnuté, veľmi zlá výživa, vychrtlosť, 14 rokov pred smrťou mu bola resekovaná časť žalúdka kvôli žalúdočným vredom

Informácie k spracovávanému materiálu boli získané na základe osobnej i písomnej komunikácie s Mgr. Janom Cvrčkom (2017-2019).

10.2 Zvieracie vzorky

Súčasťou spracovávaného súboru bolo aj 8 vzoriek odobraných zo zvieracích kostí. Tieto vzorky pochádzajú z hospodárskych zvierat, ktoré boli výraznou súčasťou stravy obyvateľstva Strednej Európy v 19. a 20. storočí. Pochádzajú z rovnakého regiónu a časového obdobia ako vzorky ľudských jedincov, vďaka čomu je možné celý súbor navzájom porovnať. Zvierací materiál tvoria štyri vzorky z prasťa (*Sus domesticus*), jedna vzorka z ovce/kozy (*Ovis aries/Capra*), dve vzorky zo sliepky (*Gallus domesticus*) a jedna vzorka z tura (*Bos taurus*). Prehľad druhov a častí kostry, na ktorých bola uskutočnená analýza, je uvedený v Tab. 10.4.

Tab. 10.4: Zoznam zvieracích druhov použitých v izotopovej analýze uhlíka a dusíka spolu s kosťou, z ktorej bola odobraná vzorka pre extrakciu kostného kolagénu

vzorka	druh	použitá kosť
01fauna	prasa domáce (<i>Sus domesticus</i>)	<i>humerus</i>
02fauna	prasa domáce (<i>Sus domesticus</i>)	<i>femur</i>
03fauna	prasa domáce (<i>Sus domesticus</i>)	<i>scapula</i>
04fauna	prasa domáce (<i>Sus domesticus</i>)	<i>radius</i>
05fauna	ovca/koza (<i>Ovis aries/Capra</i>)	<i>vertebra cervicale</i>
06fauna	kura domáca (<i>Gallus domesticus</i>)	<i>sternum</i>
07fauna	kura domáca (<i>Gallus domesticus</i>)	<i>tibiotarsus</i>
08fauna	tur domáci (<i>Bos taurus</i>)	<i>femur</i>

11 Metódy

11.1 Príprava kostného materiálu

Príprava vzoriek extrahovaného kostného kolagénu prebiehala na Antropologickom oddelení Národného múzea v Prahe.

Každému jedincovi z poskytnutého súboru bola odobraná stehenná kosť a rebro. Aspoň jedna stehenná kosť bola prítomná u 45 zo 49 jedincov, minimálne jedno rebro sa našlo u 32 zo 49 jedincov. Pomocou elektrickej píly s keramickým kotúčom bol z každej kosti odobratý kus o hmotnosti približne 0,5 g, zvyšok kosti bol uchovaný pre potreby ďalších štúdií. Odobratá vzorka bola následne mechanicky očistená od prípadných pôdnych kontaminantov či veľkých tukových častíc a zbavená spongiózy elektrickou brúskou s korundovým brúsnym nástavcom. Spongiózna kosť by mohla skresliť výsledok analýzy, pretože jej izotopové zloženie sa obmieňa výrazne rýchlejšie než v kompaktnnej kosti (Ortner 2003). Po spracovaní každej kostnej vzorky boli použité nástroje i pracovisko očistené etanolom, zamedzilo sa tak vzájomnej kontaminácii v rámci vzoriek.

Mechanicky očistené vzorky boli najskôr nadržené manuálne, za pomoci mažiara s tĺčikom. Následne sa pokračovalo drvením v elektrickom mlynčeku. Požadovaná veľkosť namletých fragmentov bola 0,4–0,7 mm. Medzi jednotlivými mletiami boli nástroje i pracovisko opäť očistené etanolom.

Ďalší stupeň prípravy kostného materiálu predstavovalo chemické očistenie namletých vzoriek. Ešte pred začatím samotnej praktickej časti výskumu boli vzorky podrobené kontrolnej metóde s cieľom poukázať na prítomnosť lipidov:

- Zaliatie kadičky so vzorkou demineralizovanou vodou na 24 hodín a následné opakované čistenie v ultrazvukovej čističke. Voda bola vymieňaná po približne 5 minútach a celý proces sa opakoval, kým nebola kvapalina v kadičke úplne číra. Nakoniec bol kostný materiál vysušený pri teplote 40 °C.

Vzorky čistené vo vode evidentne obsahovali lipidy, pretože sa po lyofilizácii (viď Kap. Dehydratácia) roztekali. Preto sa následne testovali dve najčastejšie využívané metódy s cieľom, čo najlepšie odstrániť z kostného tkaniva prípadné lipidové kontaminanty. Tie sa vyskytovali v súbore kostí často, nakoľko sa jednalo o pomerne recentný materiál. Lipidy majú zápornejšie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ než proteíny. V kostnom tkanive zastávajú úlohu energetického

zdroja, prípadne bývajú v kosti ukladané ako rezervoáre pre budúce energetické nároky organizmu (Gannes et al. 1997). Pri neodstránení lipidov z kostnej vzorky môže dôjsť k posunu hodnôt $\delta^{13}\text{C}$, izotopový pomer uhlíku sa zníži, čo vedie k celkovej nesprávnej interpretácii štúdie (Kiljunen et al. 2006). Pri lipidovej extrakcii je najčastejšie využívaná metanol-chloroformová metóda (Mintenbeck 2008; Medeiros et al. 2015). Otestované boli nasledujúce postupy:

- a) Kadička s nadrveným kostným materiálom bola zaliata roztokom metanolu a chloroformu (2:1) a na 24 hodín ponechaná v tomto roztoku a prekrytá. Pokračovalo sa na druhý deň opakovaným premývaním vzorky v roztoku v ultrazvukovej čističke, po približne 10 minútach bol roztok vymieňaný. Keď sa kvapalina prestala zakaľovať, prešlo sa na premývanie vzorky v demineralizovanej vode. Proces sa opäť opakoval toľkokrát, aby bola voda v kadičke úplne číra. Roztok bol zliaty a vzorka vysušená pri teplote 40 °C.
- b) Posledná metóda spočívala v zaliatí kadičky roztokom metanolu a chloroformu (2:1) a okamžitým premývaním pomocou ultrazvuku. Znova platilo, že sa s premývaním pokračovalo, kým sa roztok neprestal zakaľovať a následne bol premývaný opakovane v demineralizovanej vode. Nakoniec bola vzorka v kadičke takisto vysušená pri teplote 40 °C.

Ako efektívnejší z postupov sa osvedčila metóda a). Vzorky boli dostatočne očistené od lipidových častíc, pričom metódou b) sa nie vždy podarilo lipidy zo vzorky dostatočne odstrániť a krok dehydratácie musel byť opakovaný viackrát. Aby sa predišlo prípadnej lipidovej kontaminácii, ktorá by mohla v konečnom dôsledku ovplyvniť výsledky celého praktického postupu, bol zvolený postup a).

11.2 Extrakcia kolagénu

Pre extrakciu kolagénu bol použitý upravený postup z Longin (1971). K analýze bolo odobratých približne 0,25 g nadrveného kostného materiálu. Naváženie prebiehalo na analytických váhach, pričom sa prihliadalo na to, aby väčšinu vzorky tvorili väčšie a zachovalejšie úlomky. Spracovanie vzoriek neprebehlo naraz, ale po jednotlivých sériách. V každej sérii extrakcie kolagénu, ktorých bolo celkom 6, bola spracovaná aj kontrolná vzorka z ovce domácej (*Ovis aries*), ktorá slúžila ako ukazovateľ správnosti priebehu extrakcie.

11.2.1 Demineralizácia

V prvom kroku extrakcie bolo potrebné zbaviť kost' minerálnych látok, a to rozpustením v 40 ml 1 M HCl. Kadička so vzorkou v roztoku bola miešaná na magnetickom miešadle po dobu 21 minút, následne bola zmes prefiltrovaná cez filtračnú banku a dôkladne prepláchnutá demineralizovanou vodou. Materiál zachytený na filtračnom papieri bol odobraný do kadičky. Po každej vzorke bola použitá aparátúra i nástroje premyté demineralizovanou vodou.

11.2.2 Purifikácia

V tomto kroku prebiehalo opätovné odstránenie organických prímiesí, napríklad plesní a baktérií, ale aj tukov (Ambrose 1990). Materiál zbavený minerálnej zložky bol premiestnený z filtračného papieriku do kadičky s 40 ml 0,125 M NaOH, v ktorej bol pri izbovej teplote ponechaný a prikrytý po dobu 20 hodín. Následne boli vzorky prefiltrované za pomoci filtračnej banky. Použité nástroje boli opäť po každej vzorke premyté demineralizovanou vodou.

11.2.3 Solubilizácia

Kostný materiál bol z filtračného papieriku premiestnený do sklenených skúmaviek naplnených 9 ml 0,01 M HCl. Tento roztok bol ponechaný pri teplote 100 °C po dobu 17 hodín v sušičke. Počas toho došlo k rozpusteniu kolagénu v skúmavkách. Po vychladnutí skúmaviek sa vzorky prepipetovali do plastových skúmaviek s kompatibilným filtrom (filtráciou boli odstránené posledné nerozpustné kontaminanty) a boli preliate do predom zvážených plastových vialok, ktoré sa zapečatili parafilmom. Prefiltrovaná kvapalná zložka bola zmrazená v laboratórnej mrazničke. V tomto kroku boli taktiež využité jednorazové sklenené pipety a plastové skúmavky s filtrami, aby sa zamedzilo k prípadnej kontaminácii medzi jednotlivými vzorkami.

11.2.4 Dehydratácia

Zmrazené vzorky boli vysušené mrazom v lyofilizátore Cool Safe 110-4 Pro pri tlaku 0,004 hPa a teplote -110 °C. Tento proces trval približne 48 hodín. Suché vzorky vo vialkách boli zvážené na analytických váhach, čím sa stanovila konečná hmotnosť vzoriek (hmotnosť vzorky = hmotnosť vialky so vzorkou - hmotnosť prázdnej vialky), a taktiež bol zmeraný obsah kolagénu (%) v každej vzorke.

11.3 Analýza kolagénu

Zapečatené vialky s extrahovaným kolagénom boli následne odoslané do špecializovaného laboratória Iso-Analytical Ltd., v meste Crewe vo Veľkej Británii, kde boli podrobené izotopovej analýze. Využitím hmotnostnej spektrometrie typu EA-IRMS (*Elemental Analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry*) na prístroji Europa Scientific EA boli namerané konkrétne izotopové hodnoty vo vzorkách. Výsledky sú vzťahnuté na štandardné izotopové pomery uhlíku $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-pdb}}$ a dusíku $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$. Presnosť analýzy, ktorá bola stanovená za využitia referenčných štandardov, bola vyššia než 0,1 ‰ pre oba prvky.

Referenčným štandardom, ktorý bol využitý pre kontrolu kvality počas analýzy vzoriek kolagénu, bol sójový proteín (IA-R068) a ako kontrolné vzorky boli tiež využité štandardy IA-R038 (L-alanín), IA-R069 (tuniakový proteín) a IA-R046/IAEA-C7 (zmes síranu amónneho a kyseliny šťaveľovej).

11.4 Hodnotenie vzoriek

11.4.1 Zachovalosť kostí

Pre zhodnotenie stupňa degradácie organickej zložky kosti bol použitý výpočet hmotnostného zlomku kolagénu v kosti. Vďaka tejto hodnote je možné ďalej určiť, či je prítomné dostatočné množstvo materiálu pre hmotnostnú spektrometriu. Percentuálne zastúpenie kolagénu vo vzorke by malo ležať v intervale od 22 % (hodnota typická pre čerstvé kosti) do 1 % (hraničný bod zvolený pre materiál pôvodom z Európy mierneho klimatického pásma (van Klinken 1999)).

Výpočet hmotnostného zlomku pre stanovenie množstva kolagénu v kosti je daný vzorcom:

$$x = \frac{m1}{m2} * 100$$

- x = percentuálny obsah kolagénu v kosti,
- $m1$ = hmotnosť extrahovaného kolagénu,
- $m2$ = hmotnosť celkového kostného materiálu, na ktorom bola následne uskutočnená extrakcia,
- výsledok je vyjadrený v %.

Percentuálne výťažky jednotlivých vzoriek sú uvedené v Tab. 16.3 a 16.4 v Prílohe. Všetky vzorky s jedinou výnimkou privysokého výťažku (č. 22 rebro – 40,72 %) ležia v intervale od 3,63-27,00 %, pričom najnižší výťažok (č.21 rebro) je oproti priemerným hodnotám v našej vzorke oveľa nižší. Valná väčšina vzoriek leží v rozpätí 10,08-27,00 %, čo znamená, že výťažok kolagénu bol vo všetkých vzorkách dostačujúci a na jeho základe sme nemuseli vyradiť zo súboru žiadnu vzorku. Príliš vysoký výťažok by mohol znamenať kontamináciu vzorky, a preto bola vzorka č. 22 rebro venovaná pri vyhodnotení ostatných indikátorov zachovalosti i vyhodnotení izotopových dát zvýšená pozornosť.

Zvieracie vzorky vykazovali taktiež dobrú zachovalosť, a to v intervale 10,32-21,22 %. Hodnoty zodpovedajú ľudským vzorkám v súbore z rovnakej lokality a obdobia.

Hodnoty extrahovaného kolagénu v šiestich kontrolných vzorkách boli v normálnom rozpätí, ich obsah kolagénu ležal v intervale 6,35-14,84 % a bol tak dostatočný. Výťažky kolagénu kontrolných vzoriek naznačujú, že extrakcie všetkých ostatných vzoriek prebehli, v rámci možností študovaného materiálu, úspešne a navzájom porovnateľne. Zachovalosť celého súboru ľudských, zvieracích aj kontrolných vzoriek bola dobrá.

Pri hodnotení výsledkov museli byť zohľadnené aj prípadné chyby či nedostatky pracovného postupu, ktoré môžu vo výsledku skresliť konečné hodnoty. Jedná sa napríklad o stratu materiálu počas extrakcie kolagénu, ktorá môže vzniknúť prílišným nadrvením kostného materiálu a viesť k následnému poškodeniu a odfiltraniu molekúl kolagénu. Ďalej dochádza pri týchto procesoch k ulpeniu extraktu na filtračnom papieri, ktorý je kvôli vlhkému papieru ťažko odstrániť dokonale. Takisto treba zohľadniť aj straty spôsobené manipuláciou so vzorkami či nepredvídateľnými náhodnými javmi s negatívnymi dôsledkami. Zamedzeniu nepriaznivých faktorov bola venovaná maximálne pozornosť, ale úplne vylúčiť ich nebolo možné.

11.4.2 Kvalita vzoriek

Zachovalosť kostí v podobe percentuálneho zastúpenia kolagénu vo vzorke zvyčajne neposkytuje priame informácie o čistote samotného extraktu, preto je potrebné využiť iné indikátory, ktoré môžu upozorniť na prípadnú kontamináciu vzoriek. Pre posúdenie kontaminácie sme využili percentuálne zastúpenie uhlíku a dusíku v jednotlivých vzorkách a pomer C:N. Tieto indikátory sa obecné využívajú kvôli charakteristickým hodnotám kolagénu, ktorý obsahuje veľké množstvo Gly zastúpeného dvomi atómami uhlíka a jedným

atómom dusíka. To znamená, že ak by v extrakte bolo výrazné množstvo kontaminantov, malo by dôjsť k značnému posunu týchto hodnôt mimo typické rozpätie.

Pri posúdení kvality vzoriek sme zvolili primárny akceptovateľný interval hodnôt podľa práce van Klinken (1999), s prihliadnutím na voľnejšie intervaly podľa Ambrose (1990). Pomer C:N by mal ležať v intervale 3,1-3,5, tomu by malo následne odpovedať aj percentuálne zastúpenie uhlíku a dusíku. V moderných kostiach, ktoré boli súčasťou nášho výskumu, by mal byť obsah uhlíku okolo 35 % a obsah dusíku 11-16 % (van Klinken 1999). Príliš nízke hodnoty zväčša naznačujú prítomnosť anorganických nečistôt, príliš vysoké naopak upozorňujú na kontamináciu organickými zlúčeninami (van Klinken 1999). U zle zachovalých kostí vplyvom kontaminácie i diagenetických zmien, možno pozorovať celkové výrazné zníženie všetkých spomenutých indikátorov a tiež nižšie výťažky kolagénu vo vzorkách (van Klinken 1999).

Výpočtom $\frac{\text{obsah uhlíku}}{\text{obsah dusíku} \cdot 1,16}$ (vzhľadom na rozdielne relatívne atómové hmotnosti uhlíka a dusíka je nutné hodnoty dusíka vynásobiť koeficientom 1,16) sme dostali príslušné hodnoty C:N, ktoré by mali ležať vo vyššie spomínanom intervale 3,1-3,5. Všetky vzorky nášho súboru ležia po zaokrúhlení na jedno desatinné číslo v rámci tohto rozmedzia, s výnimkou 4 vzoriek sa jedná o hodnotu 3,1, čo je dolná hodnota intervalu (viď Tab. 16.3 a 16.4 v Prílohe). Štyri vzorky (č. 14, 24, 24 a 26) majú po zaokrúhlení hodnotu 3,2. Vzorky č. 14 (3,15), č. 24 má hodnotu 3,16 u oboch spracovaných kostí – rebra aj stehennej kosti – a nakoniec vzorka č. 26 má najvyšší pomer C:N – 3,19. Ostatné vzorky ležia v intervale 3,08-3,14. Tieto výsledky by mali byť v poriadku, nakoľko zodpovedajú typickému intervalu.

Obsah jednotlivých prvkov, uhlíka a dusíka, sa v našom súbore pohybuje v nasledujúcich intervaloch – pre uhlík je to 36,43-46,70 % ($\bar{x} = 41,93 \pm 1,907$ %) vo vzorke a pre dusík 13,53-17,30 % ($\bar{x} = 15,64 \pm 0,745$ %) zastúpenie vo vzorke. V prípade uhlíka sú všetky hodnoty vyššie než typická hodnota 35 %, avšak po zohľadnení voľnejších kritérií podľa Ambrose (1990), ktoré sú dané rozpätím 13-45 %, ich stále môžeme zaradiť do akceptovateľného intervalu. Najvyššie hodnoty, ktoré presahujú 45 % obsah uhlíku vo vzorke sú č. 10 rebro (46,70 %), č. 13 stehenná kosť (45,63 %) a č. 24 rebro (45,44 %). Pre dusík je veľké množstvo (28 vzoriek) nad povoleným intervalom 16 %. Pri akceptovaní miernejších kritérií hodnotenia kvality podľa Ambrose (1990), ktoré sú pre obsah dusíka 5-17 %, zapadajú do intervalu všetky vzorky, s výnimkou č. 10 rebro (17,30 %) a č. 13 stehenná kosť (17,04 %). Obe tieto vzorky majú zvýšený ako obsah uhlíka, tak aj dusíka. Recentný súbor vzoriek, ako je ten náš, môže obsahovať množstvo organických kontaminantov, najčastejšie tukové častice,

ktoré sa nepodarilo extrakciou dokonale odstrániť. Kontamináciu anorganickými zlúčeninami by sme mohli vzhľadom na vyššie hodnoty u všetkých indikátorov vylúčiť. Všetky hodnoty približne zodpovedajú akceptovateľnému rozpätiu a boli zaradené do ďalšieho spracovania s tým, že vzorkám s vyššími hodnotami obsahu uhlíka alebo dusíka bola pri ďalšom vyhodnocovaní venovaná zvýšená pozornosť.

Kvalita zvieracích vzoriek sa preukázala ako veľmi dobrá. Pomer C:N je v intervale 3,08-3,22 a percentuálne zastúpenie prvkov v rozpätí 34,87-41,74 % ($\bar{x} = 38,65 \pm 2,675$ %) pre uhlík a 12,74-15,62 % ($\bar{x} = 14,24 \pm 1,122$ %) pre dusík. Hodnoty sú prijateľné aj pre veľmi dobre zachované kosti, a preto boli vyhodnotené ako dostatočne čisté a v poriadku pre ďalšiu analýzu.

Kontrolné vzorky sa s hodnotami pomeru C:N – 3,11-3,14, obsahom uhlíka 39,01-44,79 % ($\bar{x} = 41,10 \pm 1,940$ %) a obsahom dusíka 14,45-16,71 % ($\bar{x} = 15,25 \pm 0,761$ %) taktiež nachádzajú v typickom intervale. Keďže sa však vo všetkých kontrolách jedná o rovnakú kosť, pozorujeme v hodnotách miernu variabilitu. Odchýlky medzi jednotlivými kontrolami nie sú dostatočne výrazné, aby sme mohli s istotou hovoriť o pochybení v procese extrakcie. Zamerali sme sa aj na hodnoty izotopových pomerov v kontrolných vzorkách, ktoré boli pre uhlík $\delta^{13}\text{C}$ v intervale -22,70-22,38 ‰, čo značí, že najväčší rozdiel medzi vzorkami bol 0,32 ‰ a pre $\delta^{15}\text{N}$ to boli hodnoty od 6,87-7,06 ‰ s najväčším rozdielom 0,19 ‰. Všetky tieto hodnoty majú medzi sebou veľmi nízku mieru odlišnosti. Skupiny extrakcií ($n = 6$) tak možno považovať za navzájom porovnateľné.

11.5 Štatistické vyhodnotenie vzoriek

U izotopových hodnôt uhlíka a dusíka sa testovalo normálne rozdelenie dát, a to pomocou Shapiro-Wilkovho testu normality s hladinou významnosti 0,05. Normálne rozdelenie popisuje pravdepodobnosť, s ktorou sa hodnota náhodného javu pohybuje okolo strednej hodnoty. Grafické vyjadrenie normálneho rozdelenia je pomocou Gaussovej krivky hodnoty (Zvára & Štěpán 2006).

Pre testovanie miery závislosti medzi dvoma alebo viacerým premennými bol využívaný Pearsonov korelačný test (*Pearson's product-moment correlation*) s hladinou významnosti 0,05. Pokiaľ je p-hodnota korelačného testu väčšia než 0,05, nulovú hypotézu nezamietame, ak je nižšia ako 0,05, hypotéza sa zamietá. Grafickým zobrazením Pearsonovho korelačného testu je XY bodový graf (Zvára & Štěpán 2006). V diplomovej práci sa korelačný

test používal na testovanie vzťahu medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ a indikátoroch zachovalosti (obsah uhlíka, obsah dusíka, C:N a kolagénového výťažku), ako aj na testovanie závislosti izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na niektorej z kontinuálnych premenných (vek dožitia jedinca, dátum úmrtia, počet pôrodov a počet rokov od posledného pôrodu).

Normálne rozdelenie dát v súbore je predpokladom t-testu a analýzy rozptylu. Pre hodnoty s normálnym rozdelením sa používa párový t-test alebo Welchov dvojvýberový t-test (*Paired sample t-test* alebo *Welch two sample t-test*). Párový test slúži k porovnaniu stredných hodnôt v rámci jedného výberu. Dvojvýberový t-test testuje zhodu stredných hodnôt dvoch nezávislých výberov. Pre súbor hodnôt s nenormálnym rozdelením sa používa neparametrická verzia t-testu, Wilcoxonov test (*Wilcoxon signed-rank test* alebo *Wilcoxon rank sum test with continuity correction*). V tejto diplomovej práci sa párový test používa k porovnaniu dvoch rôznych kostí (rebra a stehennej kosti) toho istého jedinca, dvojvýberový t-test k porovnaniu izotopových hodnôt medzi pohlaviami. V oboch prípadoch sa jedná o nominálne premenné. Pre porovnanie viac než dvoch nezávislých výberov sa využíva analýza variácií ANOVA, ktorej neparametrickou verziou je Kruskal-Wallisov test. ANOVA bola v diplomovej práci využitá k sledovaniu závislosti izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na SES rodín a patologických skupín. K vizualizácii t-testu a analýzy rozptylu sa využívajú krabicové grafy, ktoré poukazujú na rozdiely izotopových hodnôt medzi určenými skupinami. Na takomto type grafu možno určiť minimum, 1. kvartil, medián, 3. kvartil, maximum a odľahlé hodnoty (Zvára & Štěpán 2006).

Lineárna regresná analýza skúma vzťah medzi dvoma, prípadne viacerými premennými, kde sa predpokladá, že jedna premenná závisí od druhej premennej, ktorá ju ovplyvňuje (Neter et al. 1996). Premenných, ktoré ovplyvňujú môže byť viac. V diplomovej práci bol využitý štatistický lineárny model, ktorým bola testovaná závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na piatich premenných – pohlavie, vek dožitia jedinca, dátum úmrtia, príslušnosť k rodine a zdravotný stav. Po vytvorení základného lineárneho modelu v štatistickom programe bol využívaný ANOVA test, ktorý pre každú premennú vyniesol p-hodnotu. Na základe p-hodnôt sa rozhodovalo o vynechaní premennej s najvyššom p-hodnotou vyššou než 0,05 z modelu. Následne bol vytvorený nový základný model bez premennej s najvyššou p-hodnotou, u ktorého bol opäť použitý ANOVA test, ktorý vyniesol nové p-hodnoty, už len pre 4 premenné. Najvyššia p-hodnota sa opäť vyradila a testovanie pokračovalo, až kým neostali premenné len s nižšími p-hodnotami ako 0,05, a teda premenné s významným vplyvom na izotopové hodnoty. Model, v ktorom už nie je premenná s p-hodnotou väčšou než 0,05 je konečný (Neter et al. 1996; osobná komunikácia s Mgr. Alenou Černíkovou, Ph.D. 2019).

Každý z osteobiografických parametrov (pohlavie, vek, zdravotný stav, atď.) bol testovaný na izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$, zvlášť pre stehennú kosť a rebro. Štatistické spracovanie výsledkov prebiehalo v programe Rstudio.

12 Výsledky

Kapitola je rozčlenená na deväť podkapitol. Prvá podkapitola sa zaoberá hodnotením kritérií zachovalosti a izotopovej analýze zvieracích vzoriek. Ostatné podkapitoly sú venované jednak samotnej izotopovej analýze ľudských vzoriek a hodnoteniu kritérií zachovalosti, ale tiež vplyvom jednotlivých faktorov (vek dožitia, dátum úmrtia, zdravotný stav a iné) na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$.

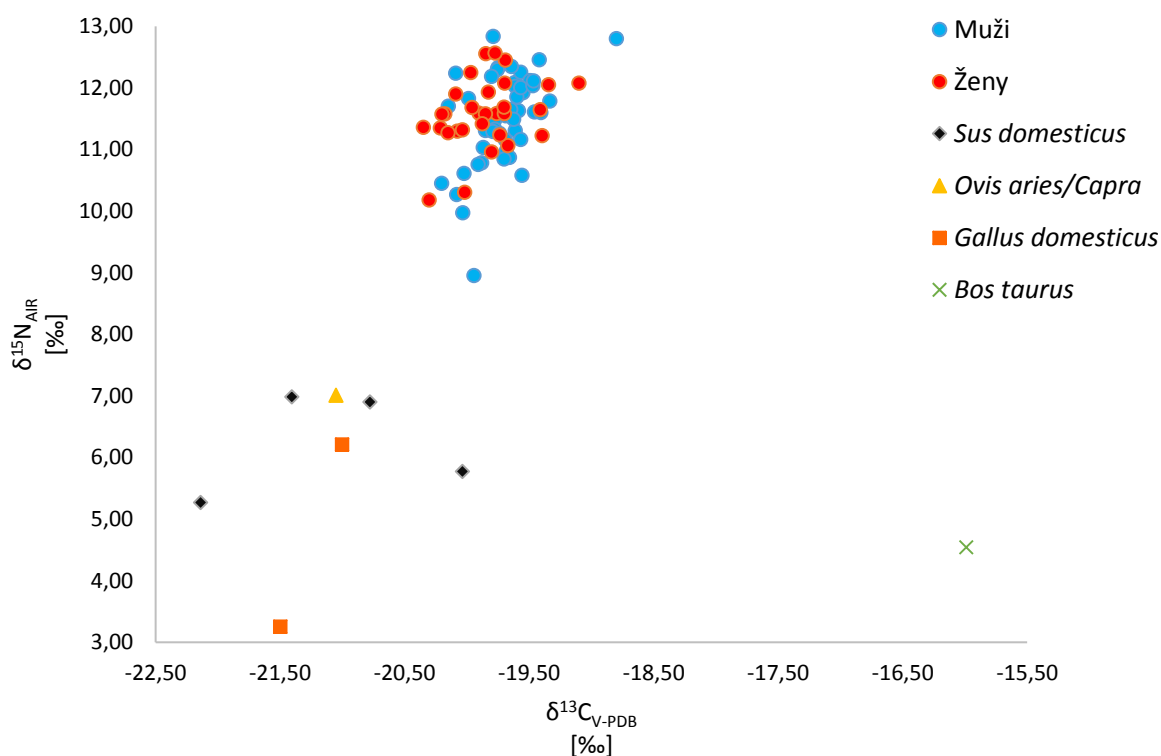
12.1 Zvieracie vzorky

Zvieracie vzorky bez výnimky splnili kritériá zachovalosti. Medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ a korelátmi pre zachovalosť nebola pozorovaná žiadna závislosť (viď Tab. 12.1).

Tab. 12.1: P-hodnoty Pearsonovho testu izotopových hodnôt a kritérií zachovalosti zvieracích vzoriek

		Výťažok [%]	Obsah uhlíka [%]	Obsah dusíka [%]	C:N
Zvieracie vzorky	$\delta^{13}\text{C}$	0,4647	0,7636	0,6077	0,1498
	$\delta^{15}\text{N}$	0,2849	0,9643	0,9567	0,5554

Výsledky izotopovej analýzy zvieracích vzoriek sú uvedené v Tab 16.3 v Prílohe. Zvieracie vzorky majú pre izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ rozmedzie -22,14--15,99 ‰ ($\bar{x} = -20,49 \pm 1,91$ ‰, $n = 8$) a pre hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ rozmedzie 3,26-7,01 ‰ ($\bar{x} = 5,75 \pm 1,34$ ‰, $n = 8$). Izotopové hodnoty sa líšia medzi jednotlivými druhmi či čeľadami len nevýrazne. Pre štyroch zástupcov čeľade *Suidae* sú hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ nasledovné – -22,14, -20,04, -21,41 -20,78 ‰ a hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ – 5,27, 5,78, 6,99 a 6,90 ‰. Priemerné hodnoty všetkých vzoriek čeľade *Suidae* sú -21,09 ‰ pre uhlík a 6,23 ‰ pre dusík. Pre dvoch zástupcov čeľade *Galliformes* sú tieto hodnoty -21,00 a -21,50 ‰ pre uhlík (priemerná hodnota je -21,25 ‰) a 6,21 a 3,26 ‰ pre dusík (priemerná hodnota je 4,74 ‰). Ďalej boli do súboru zaradené dve vzorky z čeľade *Bovidae* (ovca a tur) s hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ -21,05 a 15,99 ‰ a $\delta^{15}\text{N}$ 7,01 a 4,54 ‰. Po spriemerovaní všetkých zvieracích vzoriek sme dostali izotopové hodnoty uhlíka -20,49 ‰ a dusíka 5,75 ‰. Výsledky izotopovej analýzy zvierat spolu s výsledkami stehenných kostí ľudských vzoriek sú zobrazené na Grafe 12.1.



Graf 12.1: Izotopové hodnoty zvieracích a ľudských vzoriek z rovnakej lokality a obdobia

Z výsledkov izotopovej analýzy uhlíku (priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ je $-20,49$ ‰) možno usúdiť, že odpovedajú C3 ekosystému, pripustiť možno konzumáciu C4 rastlín v malom množstve hospodárskymi zvieratami. Izotopová hodnota uhlíka u tura domáceho (*Bovidae*) sa výrazne odlišuje od ostatných hospodárskych zvierat, pričom v hodnote dusíka nie je pozorovaná odchýlka.

12.2 Ľudské vzorky

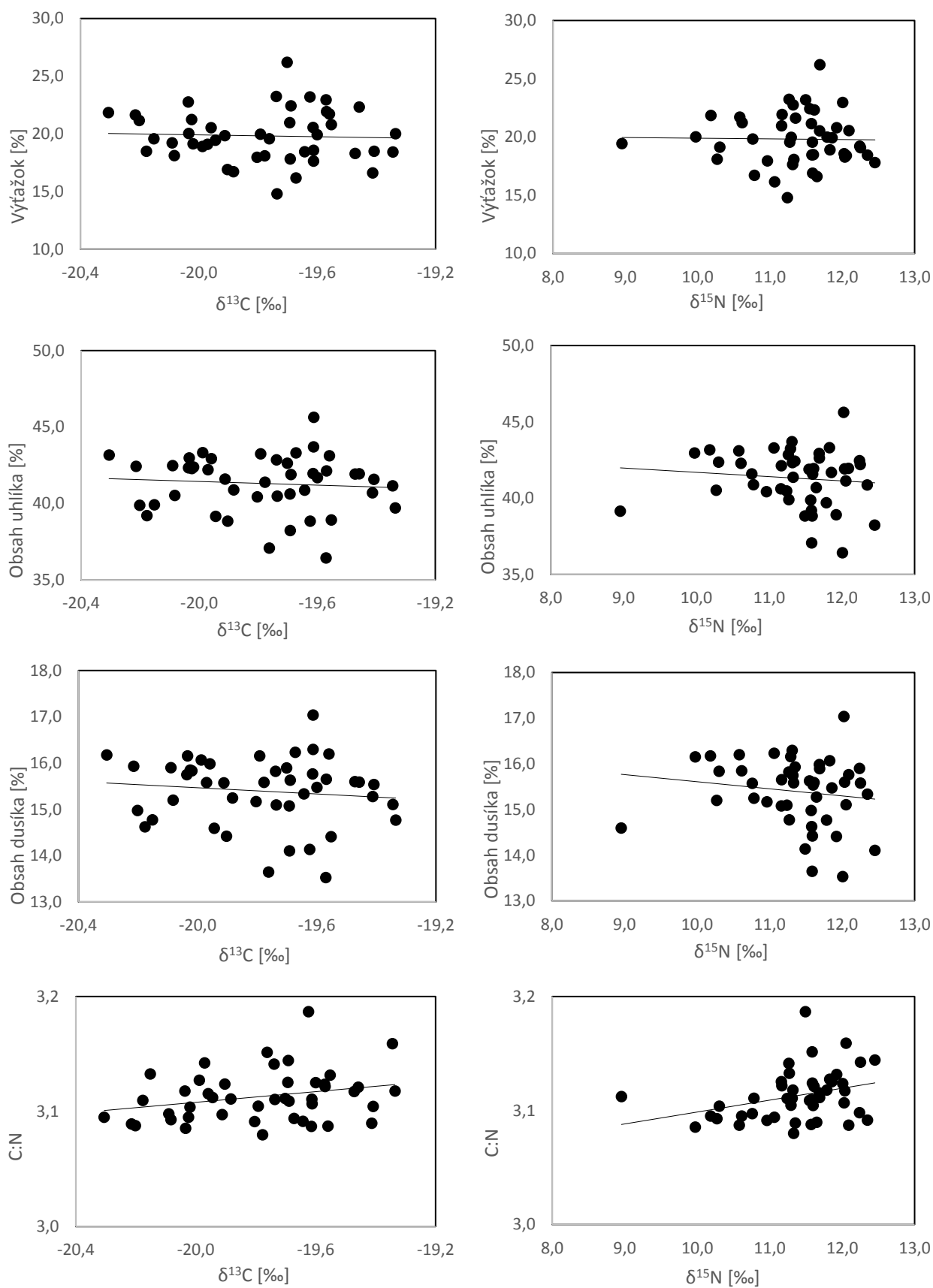
Všetky ľudské vzorky splnili kritériá zachovalosti (van Klinken 1999; Ambrose 1990) s jedinou výnimkou vzorky č. 22 rebro, ktorá mala výrazne vyšší výťažok než zvyšné vzorky, ostatné kritériá zachovalosti spĺňali požadované rozpätie hodnôt. Vo vzorkách stehennej kosti bola pozorovaná závislosť medzi izotopovými hodnotami dusíka a pomerom C:N (korelačný koeficient = 0,325). Vo vzorkách rebra bola zaznamenaná závislosť medzi hodnotami uhlíka a percentuálneho výťažku kolagénu (korelačný koeficient = 0,435) a pomerom C:N (korelačný koeficient = 0,371) a tiež medzi hodnotami dusíka a percentuálnym výťažkom kolagénu (korelačný koeficient = 0,351 (viď Tab. 12.2 a Graf 12.2 a 12.3)).

Tab. 12.2: P-hodnoty Pearsonovho testu izotopových hodnôt a kritérií zachovalosti ľudských vzoriek, rozdelené zvlášť pre stehennú kosť a rebro. Zvýraznené hodnoty predstavujú p-hodnotu menšiu než 0,05 a značia štatisticky významnú závislosť.

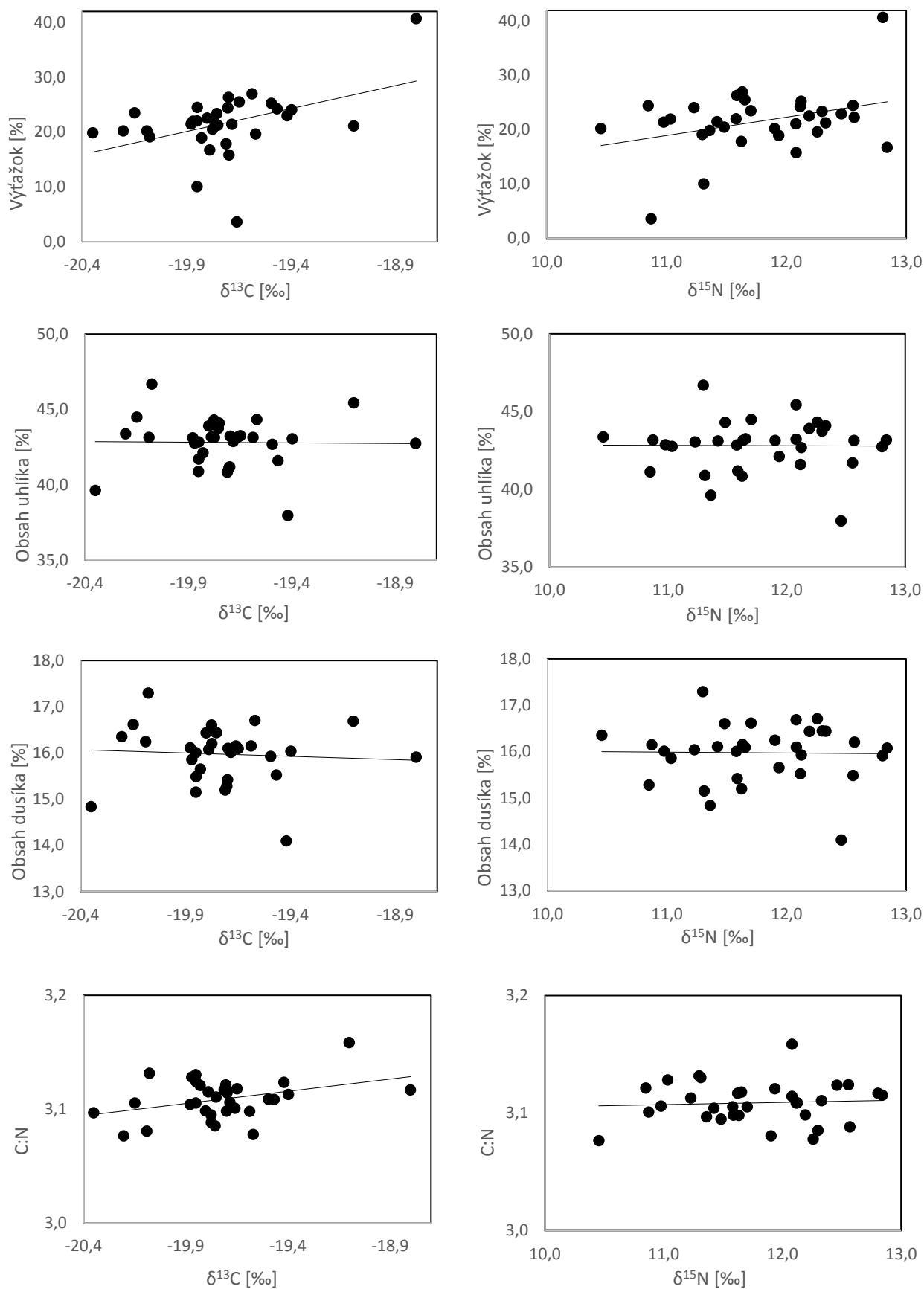
		Výtťažok [%]	Obsah uhlíka [%]	Obsah dusíka [%]	C:N
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,7621	0,585	0,446	0,09618
	$\delta^{15}\text{N}$	0,9039	0,4927	0,3346	0,02925
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,01289	0,9253	0,6987	0,0367
	$\delta^{15}\text{N}$	0,04909	0,9584	0,9266	0,6879

V prípade závislosti na troch indikátoroch zachovalosti v rebrách bola pozorovaná výrazne odchylená hodnota u výtťažku vzorky č. 22 (40,72 %) a v pomere C:N vzorky č. 24 (3,16). Po vyradení vzorky č. 22 boli p-hodnoty v rebrách pre koreláciu medzi hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a výtťažkom 0,4454 a medzi $\delta^{15}\text{N}$ a výtťažkom 0,2483. Z opakovaného testovania korelácie medzi $\delta^{13}\text{C}$ a C:N bola vyradená vzorka č. 24, čím sa následne zvýšila p-hodnota na 0,2552. Po vyradení dvoch vzoriek s výrazne odľahlými hodnotami nebola pozorovaná žiadna významná korelácia medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ a indikátormi zachovalosti v rebrách. Po vyradení vzoriek s najvýraznejšími odchýlkami v prípade korelácie medzi izotopovými hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ a C:N stehenných kostí ostala p-hodnota stále menšia ako 0,05, táto závislosť bola stále významná, avšak blízko hranice štatistickej významnosti. Tieto výsledky potvrdzujú, že náš súbor vzoriek nebol systematicky kontaminovaný.

Vzorky č. 22 a 24 (rebro) vykazovali výraznú odchýlku len u jedného zo štyroch kritérií zachovalosti, ostatné indikátory boli v rámci požadovaných intervalov, preto sme sa rozhodli vzorky ponechať v študovanom súbore a zaradiť ich do ďalšieho testovania. V ďalšom testovaní im bude venovaná zvýšená pozornosť.

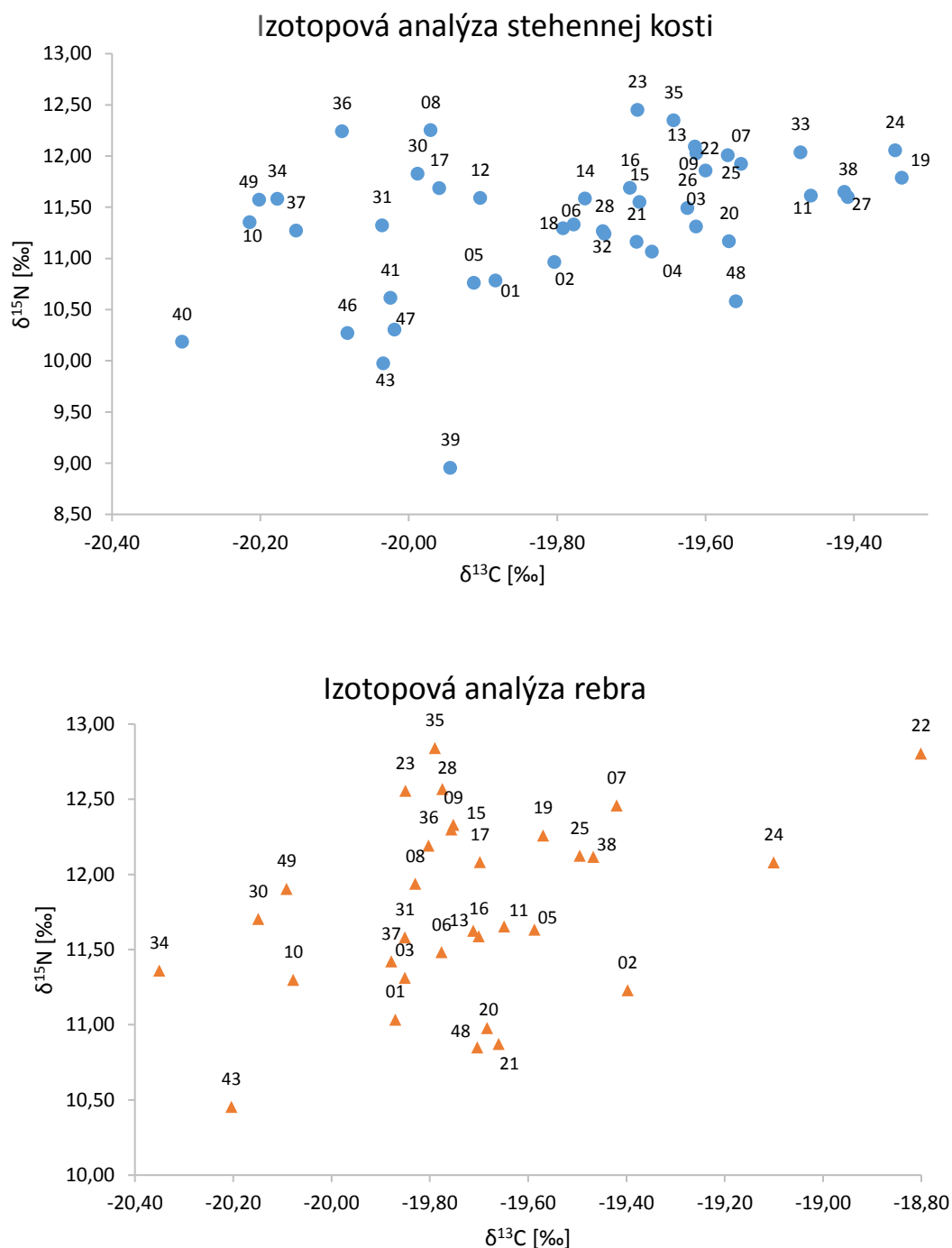


Graf 12.2: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na indikátoroch zachovalosti v ľudských vzorkách stehenných kostí.



Graf 12.3: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na indikátoroch zachovalosti v ľudských vzorkách rebier.

Výsledky izotopovej analýzy študovaného súboru ľudských vzoriek sú uvedené v Tab. 16.4 v Prílohe. Izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ pre ľudské vzorky ležia v rozmedzí -20,31--19,34 ‰ ($\bar{x} = -19,78 \pm 0,25$ ‰, $n = 45$) pre stehenné kosti a v rozmedzí -20,35--18,80 ‰ ($\bar{x} = -19,73 \pm 0,30$ ‰, $n = 32$) pre rebrá. Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ ľudských vzoriek sú v intervale 8,96-12,45‰ ($\bar{x} = 11,37 \pm 0,69$ ‰, $n = 45$) pre stehenné kosti a v intervale 10,45-12,84 ‰ ($\bar{x} = 11,77 \pm 0,60$ ‰, $n = 32$) pre rebrá (viď Graf 12.4 a 12.5).



Graf 12.4 a 12.5: Izotopová analýza stehenných kostí a rebier ľudských vzoriek.

Rozloženie izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí i rebier bolo testované Shapiro-Wilkovým testom normality (viď Tab. 12.3). Izotopové hodnoty uhlíka vykazovali normálne rozloženie dát v stehennej kosti a nenormálne v rebrách a naopak, izotopové hodnoty dusíka majú normálne rozloženie vo vzorke rebier a nenormálne v stehenných kostiach.

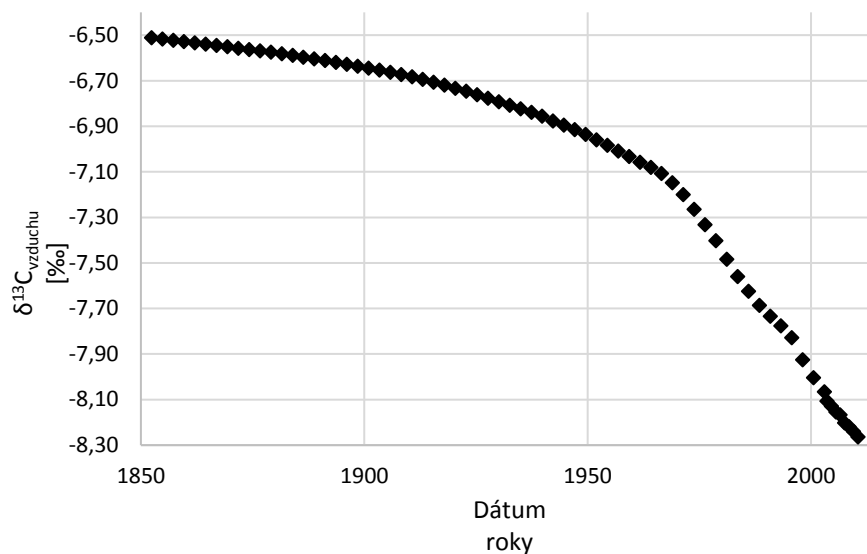
Tab. 12.3: P-hodnoty Shapiro-Wilkovho testu normality, kde zvýraznené p-hodnoty znamenajú nenormálne rozloženie dát.

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,3101
	$\delta^{15}\text{N}$	0,006288
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,04322
	$\delta^{15}\text{N}$	0,8428

12.3 Závislosť izotopových hodnôt na dátume úmrtia

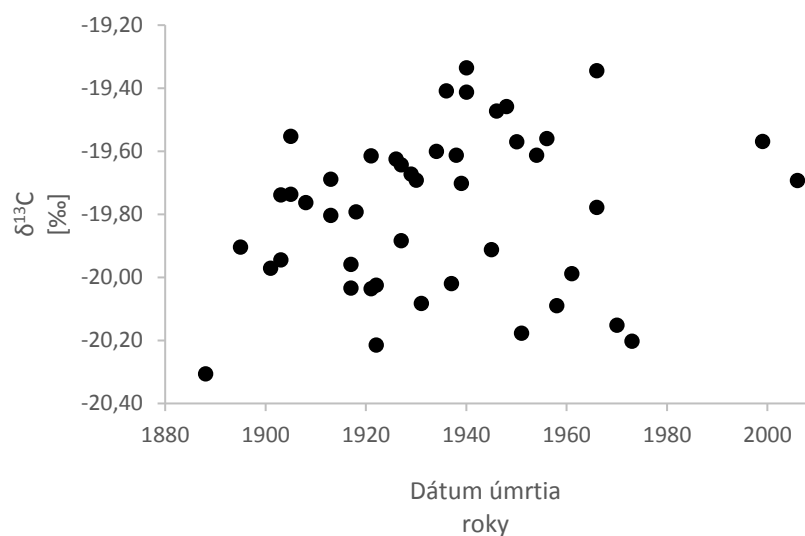
Po prijatí výsledkov z izotopovej analýzy bola prvým krokom úprava izotopových výsledkov uhlíka vzhľadom na rok úmrtia daného jedinca podľa Ferrio et al. (2005). Upravené hodnoty sme následne porovnali s pôvodnými neupravenými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$, a po zohľadnení lokálnych faktorov nášho súboru jedincov rozhodli, ktoré hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ budú použité pre ďalšie štatistické spracovanie výsledkov. Úprava hodnôt prebiehala nasledovne:

1. Vyniesli sme z tabuľky (viď Tab. 16.5 v Prílohe) zo štúdie Ferrio et al. (2005) hodnoty atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ pre obdobie 1850-2010, čiže z obdobia úmrtí jedincov v našej vzorke. Počas tohto obdobia je zaznamenaná výrazná zmena izotopových hodnôt atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ v čase v rámci vymedzeného obdobia podľa dátumu úmrtia vzoriek v našom súbore (viď Graf 12.6).

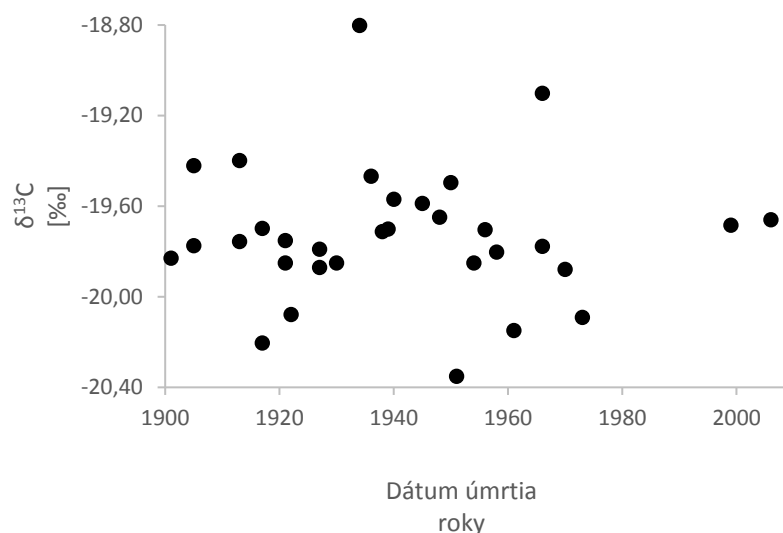


Graf 12.6: Zmena izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ v čase medzi rokmi 1850-2010 podľa Ferrio et al. (2005)

2. Zohľadnili sme dopad zmeny izotopových hodnôt atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ na izotopové hodnoty našich vzoriek. Najprv sme testovali koreláciu pôvodných kolagénových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ nášho súboru Pearsonovým korelačným testom. P-hodnota stehenných kostí bola 0,8975, rebier 0,2198. V Grafoch 12.7 a 12.8 sú zobrazené výsledky testovania závislosti neupravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ na roku úmrtia jedinca. U žiadnej z kostí nebola zaznamenaná významná závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ na dátume úmrtia.



Graf 12.7: Závislosť neupravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí na dátume úmrtia.

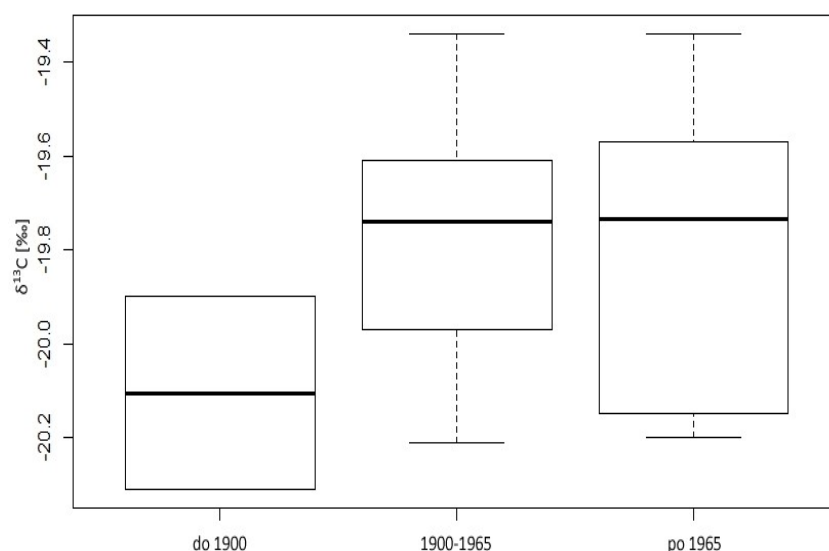


Graf 12.8: Závislosť neupravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ rebier na dátume úmrtia.

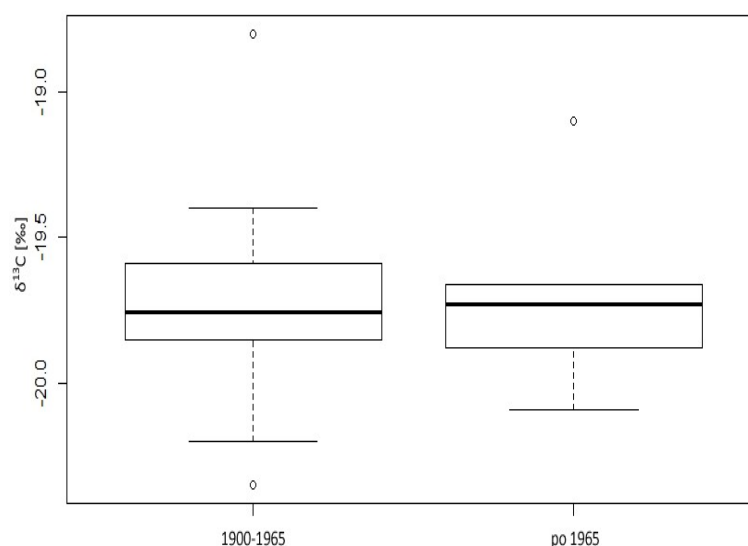
Na základe grafu 12.6, ktorý poukazuje na výraznejšiu zmenu v hodnotách atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ na prelome 19. a 20. storočia a okolo roku 1965, sme rozdelili našu vzorku jedincov do troch skupín podľa roku úmrtia:

- 1. skupina – do roku 1900
- 2. skupina – 1900-1965
- 3. skupina – po roku 1965

Tieto skupiny sme podrobili ANOVA testu, ktorý nepreukázal žiadny signifikantný rozdiel medzi skupinami. Prvá skupina bola však veľmi malá, v testovaní stehenných kostí ju tvorili len dve vzorky, v prípade rebra dokonca žiadna vzorka, všetci jedinci umreli až po roku 1900. Aj preto môžu byť výrazne nižšie izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí jedincov v 1. skupine náhodné. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ nezodpovedajú hypotéze, že skôr žijúci jedinci by mali mať z dôvodu spaľovania fosílnych palív vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ než neskôr žijúci. Pre biologicky signifikantné výsledky je potrebný väčší súbor jedincov. P-hodnota stehenných kostí je v prípade rozdelenia jedincov na tri skupiny podľa dátumu úmrtia 0,383. V prípade rebier je p-hodnota 0,792. Rozpätie izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ medzi skupinami je graficky zobrazené na Graf 12.9 a 12.10.



Graf 12.9: Neupravené izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí jedincov rozdelených podľa roku úmrtia



Graf 12.10: Neupravené izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ rebier jedincov rozdelených podľa roku úmrtia

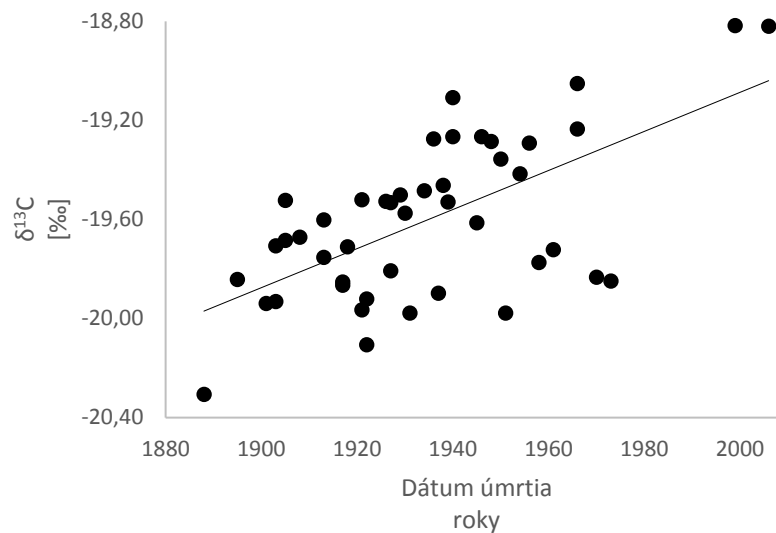
3. Korelácia medzi hodnotami atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ v roku úmrtia a samotným rokom úmrtia je signifikantná. V našom prípade bolo dôležité preukázať koreláciu medzi rokom úmrtia jedincov v našom súbore a upravenými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ v kostnom kolagéne. Jedinec, ktorý umrel najdávnejšie (pri analýze stehenných kostí je to jedinec č. 40, u rebier č. 8) bol stanovený ako bod 0, jeho hodnota $\delta^{13}\text{C}$ zostala neupravená. Pre každého jedinca bol vypočítaný priemer hodnôt atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ za dané obdobie života (viď 4. bod), ktorý bol odpočítaný od priemeru najdávnejšie umretého jedinca.

Túto vypočítanú hodnotu sme následne pripočítali k pôvodným hodnotám $\delta^{13}\text{C}$ každého jedinca (viď Tab. 16.6 a 16.7 v Prílohe).

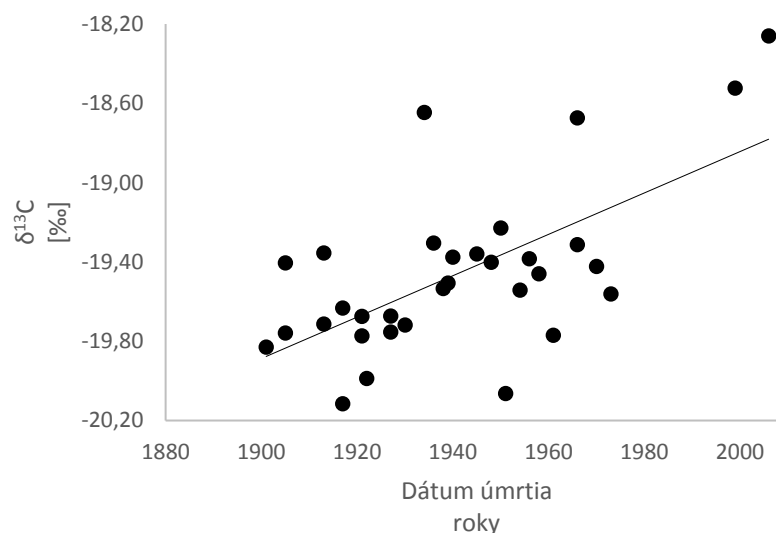
4. Pre každého jedinca sme vypočítali priemer hodnôt atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ za danú časť života. Pre rôzne kosti sme stanovili odlišný časový interval. Pomaly remodelujúce stehenné kosti mali určené rozmedzie od dosiahnutia dospelosti, ktoré zodpovedá veku 20 rokov, do konca života jedinca. Izotopové hodnoty uhlíka i dusíka v kostnom kolagéne odzrkadľujú veľmi dlhé časové obdobie zo života jedinca, minimálne posledných 20 rokov pred smrťou človeka. V našej vzorke sme skutočne spriemerovali hodnoty atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ v minimálnom rozpätí 20-tich rokov života. Výnimku tvorilo len 5 vzoriek jedincov, ktorí umreli vo veku nižšom než je 40 rokov, preto počet spriemerovaných rokov u nich bol menší než 20 rokov. Boli to jedinci č. 5 (vek dožitia 32 rokov, priemer hodnôt bol z posledných 12-tich rokov života), 6 (22 rokov), 12 (29 rokov), 14 (37 rokov) a 42 (20 rokov). U rebier bol stanovený interval posledných 10 rokov života, pokiaľ sa jedinec dožil minimálne 30 rokov. Jedinci, ktorí sa dožili menej než 30 rokov (č. 6 a 42) mali rozmedzie dané počtom rokov po dovŕšení dospelosti v 20-tich rokoch života. Jedinec č. 6 sa dožil 22 rokov, spriemerovali sa spolu posledné 3 roky života, jedinec č. 42 sa dožil presne 20 rokov, preto bolo pre priemer hodnôt rokov použité len jedno číslo.
5. Po premene týchto hodnôt podľa vopred stanovených rovníc sme získali nové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ (viď Tab. 16.8 v Prílohe), ktoré sme otestovali pre závislosť na dátume úmrtia Pearsonovým korelačným testom. Závislosť medzi upravenými izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a dátume úmrtia sa prejavila ako veľmi silná v prípade oboch kostí (viď Graf 12.11 a 12.12). Tab. 12.4 zobrazuje porovnanie pôvodných, neupravených hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ spolu s novými, prepočítanými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$.

Tab. 12.4: Porovnanie p-hodnôt pôvodných a upravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$

		p-hodnota
Stehenná kosť	pôvodné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	0,8975
	nové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	$4,45 \cdot 10^{-6}$
Rebro	pôvodné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	0,2198
	nové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	$8,91 \cdot 10^{-5}$



Graf 12.11: Závislosť upravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí na dátume úmrtia.



Graf 12.12: Závislosť upravených izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ rebier na dátume úmrtia.

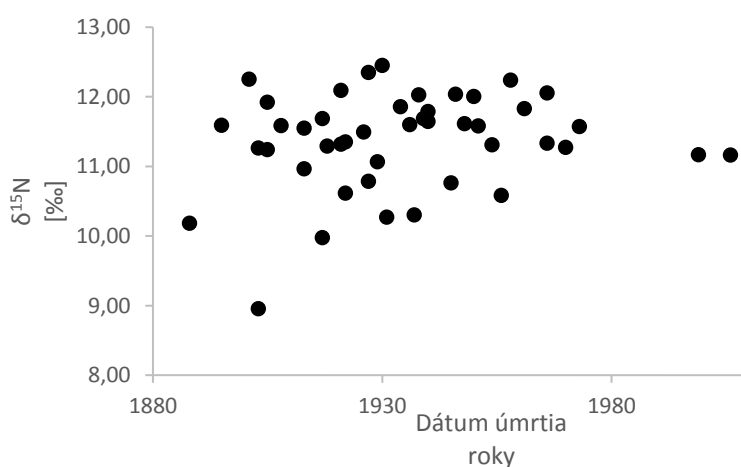
6. Na základe analýzy upravených hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ sme zistili, že prácou s takto upravenými hodnotami v ďalšom testovaní súboru by sme si do výsledkov pravdepodobne vnášali chybu. Práca Ferrio et al. (2005) je založená na meraní jadier antarktických ľadovcov, a je možné, že v prostredí nášho súboru bola zmena hodnôt uhlíka menej výrazná. Teoreticky je možné, že viac záporné hodnoty lokálneho prostredia boli kompenzované vyššou konzumáciou potravín so zvýšenými hodnotami izotopu ^{13}C , napríklad prosa, kukurice či morských rýb. Avšak vzhľadom na skúmanú vzorku jedincov to nie je

pravdepodobné. Kvôli vylúčeniu chyby sme sa rozhodli pre ďalšie štatistické testy využívať len pôvodné, nekorigované hodnoty $\delta^{13}\text{C}$.

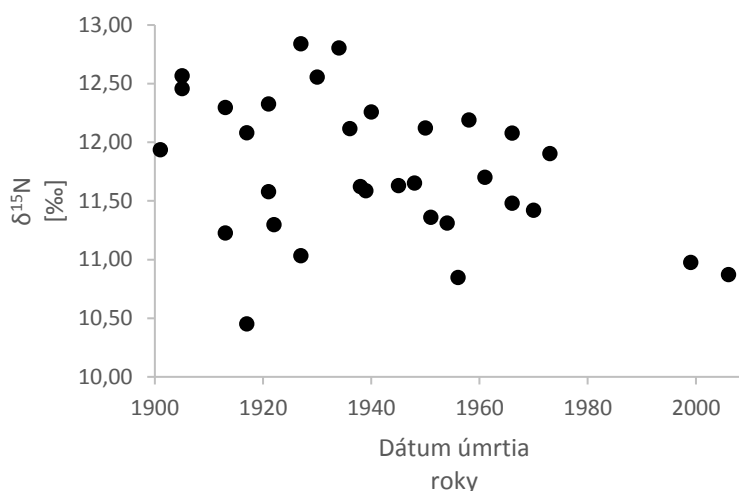
Vplyv roku úmrtia na izotopové hodnoty dusíka v našej vzorke sme skúmali na základe environmentálnych faktorov v podobe zmeny typu hnojenia v lokalite, z ktorej naša vzorka jedincov pochádza. Interval obdobia od roku úmrtia prvého a posledného zomretého jedinca v našom súbore bol 1888-2006. Tieto hodnoty sme testovali pre každú kosť oddelene. Závislosť bola testovaná Pearsonovým korelačným testom. Test preukázal koreláciu medzi presným rokom úmrtia jedinca a izotopovými hodnotami len v prípade $\delta^{15}\text{N}$ v stehennej kosti (viď Tab. 12.5 a Graf 12.13 a 12.14). Pri vyradení dvoch vzoriek s odľahlými rokmi úmrtia oproti ostatným vzorkám, a to jedincov č. 20 s rokom úmrtia 1999 a č. 21 s rokom úmrtia 2006, bola p-hodnota Pearsonovho korelačného testu 0,1001, test tak nepreukázal signifikantnú koreláciu izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v stehenných kostiach na dátume úmrtia jedincov. Vysvetlením by mohla byť zmena prostredia v čase, a s tým spojené zvýšené používanie syntetických hnojív, ktoré znižuje hodnoty $\delta^{15}\text{N}$. Výsledky budú zohľadnené vzhľadom k izotopovým hodnotám týchto vzoriek. Ak by však signifikantná korelácia bola skutočne daná odľahlými vzorkami č. 20 a 21, pozorovaná závislosť by sa očakávala aj v rebrách.

Tab. 12.5: P-hodnoty Pearsonovho korelačného testu korelácie izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ kostí na dátume úmrtia jedinca. Zvýraznená hodnota poukazuje na signifikantnú koreláciu.

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{15}\text{N}$	0,03272
Rebro	$\delta^{15}\text{N}$	0,2651



Graf 12.13: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí na dátume úmrtia jedinca.



Graf 12.14: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ rebier na dátume úmrtia jedinca.

12.4 Vzťah medzi izotopovými hodnotami a typom kosti

U 32 jedincov sme mali k dispozícii ako rebro, tak stehennú kosť. Keďže sa jedná o kosti s rôznou rýchlosťou remodelácie kostného kolagénu, predpokladala sa medzi nimi rozdielna variabilita v izotopových hodnotách uhlíka a dusíka. Rebrová kosť je jedna z najrýchlejšie remodelujúcich kostí v ľudskom tele, ktorá by mala všeobecne vykazovať vyššiu variabilitu vo svojich izotopových hodnotách ako pomalšie remodelujúca stehenná kosť. Vyššia variabilita hodnôt v rebrách je daná výraznejším vplyvom pôsobenia krátkodobých faktorov predchádzajúcich smrti a postupným zhoršovaním sa zdravotného stavu (Fahy et al. 2017). Priemerné izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ oboch kostí spolu so smerodajnými odchýlkami (SD) sú zobrazené v Tab. 12.6.

Tab. 12.9: Priemerné hodnoty a SD izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí a rebier

kosť	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]
stehenná kosť	-19,77 ($\pm 0,25$)	11,54 ($\pm 0,55$)
rebro	-19,73 ($\pm 0,30$)	11,77 ($\pm 0,60$)

Pre testovanie vzťahu medzi izotopovými hodnotami a typom kosti, boli najprv hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebra a stehennej kosti vo vybranej skupine 32 jedincov podrobené Shapiro-Wilkovmu testu normality (viď Tab. 12.7)

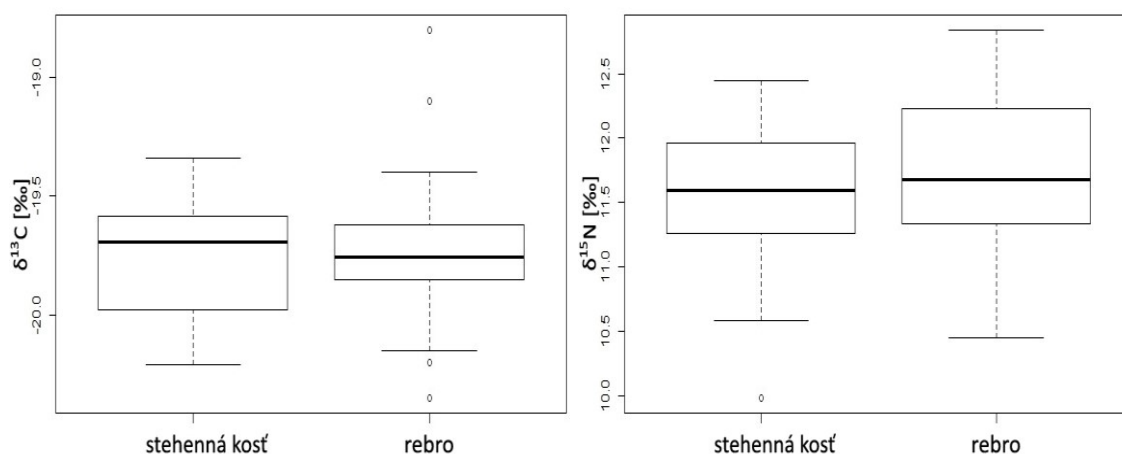
Tab. 12.7: P-hodnoty Shapiro-Wilkovho testu normality, kde zvýraznená hodnota znamená nenormálne rozdelenie dát v sledovanej skupine

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,148
	$\delta^{15}\text{N}$	0,3926
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,04322
	$\delta^{15}\text{N}$	0,8428

Rozptyl izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v rámci kostí bol testovaný variabilitou rozptylu (viď Tab. 12.8). Krabicové grafy (viď Graf 12.15) poukazujú na mierne väčší rozptyl v hodnotách ako $\delta^{13}\text{C}$, tak i $\delta^{15}\text{N}$ rebier, pri analýze $\delta^{13}\text{C}$ je to spôsobené mnohými odlahlými vzorkami, ktoré ležia mimo 1.-3. kvartil. Grafy naznačujú väčšiu variabilitu v izotopových hodnotách rebrových kostí.

Tab. 12.8: Variabilita rozptylu medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ medzi stehennou kosťou a rebrom

p-hodnota	
$\delta^{13}\text{C}$	0,3626
$\delta^{15}\text{N}$	0,6298



Graf 12.15: Krabicové grafy zobrazujú minimum a maximum, 1. a 3. kvartil, medián a odlahlé hodnoty izotopovej analýzy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na stehennej kosti a rebre

Keďže test normality ukázal, že hodnoty oboch izotopov v stehennej kosti majú normálne rozloženie, ale v rebrovej kosti je p-hodnota $\delta^{13}\text{C}$ nižšia než 0,05 a vykazuje tak nenormálne rozloženie hodnôt, testovali sa izotopy medzi kosťami rozličnými testami. Na porovnanie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ rebra a stehennej kosti toho istého jedinca sa použil párový t-test a pre porovnanie $\delta^{13}\text{C}$ slúžila neparametrická obdoba t-testu, Wilcoxonov test (viď Tab. 12.9). V izotopových hodnotách uhlíka ani dusíka medzi kosťami nebol zistený žiadny štatisticky signifikantný rozdiel.

Tab. 12.9: Analýza stabilných izotopov uhlíka a dusíka dvoch rozdielnych kostí (rebra a stehennej kosti) u rovnakých jedincov testovaná párovým t-testom pre dusík a Wilcoxonovým testom pre uhlík

	p-hodnota
$\delta^{13}\text{C}$	0,5715
$\delta^{15}\text{N}$	0,1243

12.5 Závislosť izotopových hodnôt na pohlaví

Priemerné izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ oboch pohlaví sú zobrazené v Tab. 12.10. Pred samotným testovaním závislosti izotopových hodnôt na pohlaví, sme hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehennej kosti a rebra oboch pohlaví rozdelili do ôsmich kategórií, ktoré boli podrobené Shapiro-Wilkovmu testu normality (viď Tab.12.11). Normálne rozloženie sa preukázalo takmer vo všetkých kategóriách, výnimku tvorili kategórie $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí mužov a $\delta^{13}\text{C}$ rebier mužov.

Tab. 12.10: Priemerné hodnoty a SD izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí a rebier mužov a žien

		priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]
stehenná kosť	muži	-19,71 ($\pm 0,21$)	11,33 ($\pm 0,77$)
	ženy	-19,89 ($\pm 0,27$)	11,44 ($\pm 0,57$)
rebro	muži	-19,68 ($\pm 0,28$)	11,75 ($\pm 0,68$)
	ženy	-19,80 ($\pm 0,32$)	11,80 ($\pm 0,46$)

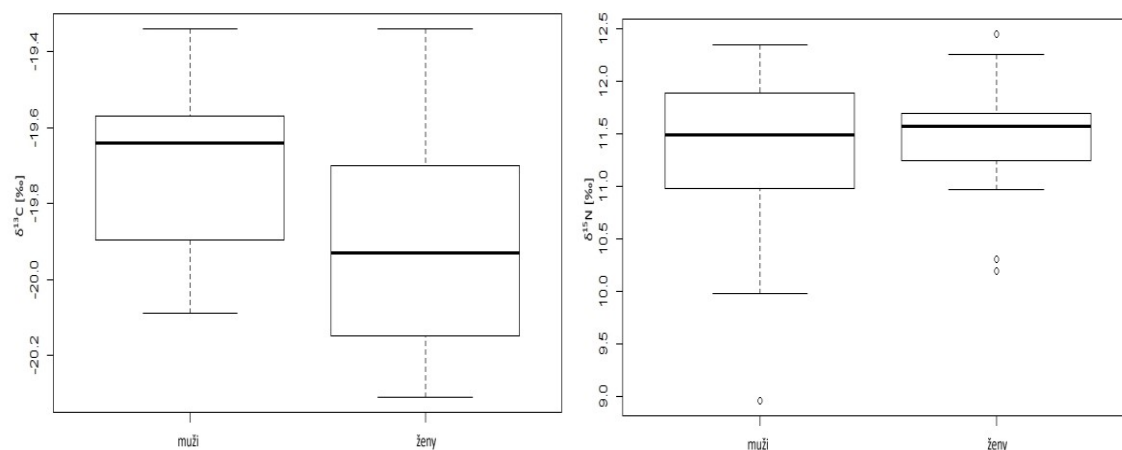
Tab. 12.11: Zobrazuje 8 kategórií a ich p-hodnotu na základe Shapiro-Wilkovho testu normality. Zvýraznené výsledky majú p-hodnotu menšiu než 0,05 a nezodpovedajú tak normálnemu rozloženiu.

p-hodnota			
$\delta^{15}\text{N}$	stehenná kosť	muži	0,02005
		ženy	0,2605
	rebro	muži	0,5532
		ženy	0,2336
$\delta^{13}\text{C}$	stehenná kosť	muži	0,1519
		ženy	0,5325
	rebro	muži	0,01356
		ženy	0,5121

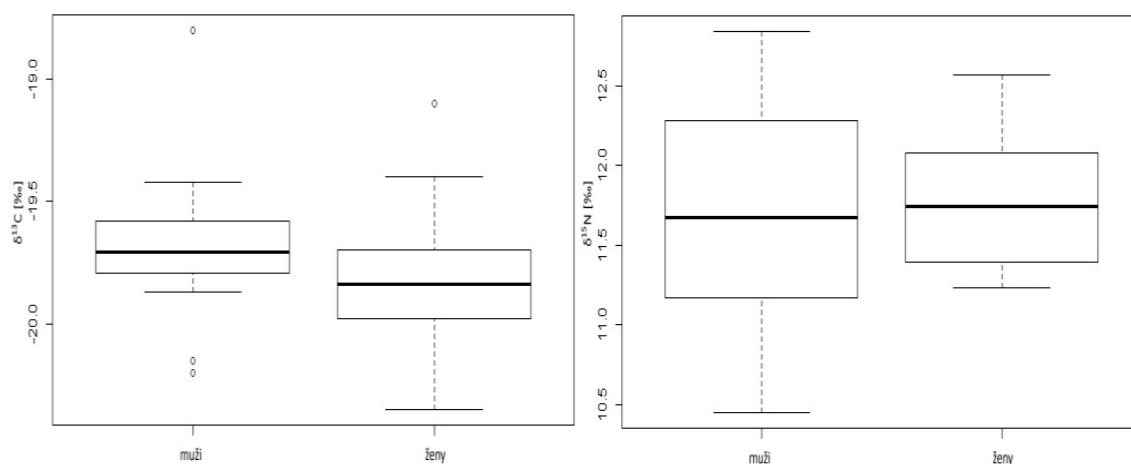
Ďalej sme pokračovali porovnaním jednotlivých hodnôt medzi pohlaviami. V prípade porovnania pohlaví izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v rebrách a $\delta^{13}\text{C}$ v stehenných kostiach sme použili Welchov dvojvýberový t-test, v prípade porovnania izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v stehenných kostiach a $\delta^{13}\text{C}$ v rebrách Wilcoxonov test. Výsledky testov sú zobrazené v Tab. 12.12 a Graf 12.16 a 12.17. Štatisticky signifikantný rozdiel medzi pohlaviami bol preukázaný len v prípade izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ v stehennej kosti, kedy boli u mužov tieto izotopové hodnoty výrazne zvýšené. Rozdiel medzi priemernou hodnotou $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí mužov a žien bol 0,18 ‰ (viď Tab. 12.10).

Tab. 12.12: P-hodnoty Welchovho dvojvýberového t-testu a Wilcoxonovho testu. Zvýraznená hodnota vykazuje signifikantný rozdiel izotopových pomerov medzi pohlaviami.

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,02658
	$\delta^{15}\text{N}$	0,8712
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,1551
	$\delta^{15}\text{N}$	0,8021



Graf 12.16: Krabicové grafy zobrazujú minimum a maximum, 1. a 3. kvartil, medián a odľahlé hodnoty izotopovej analýzy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na stehenných kostí mužov a žien



Graf 12.17: Krabicové grafy zobrazujú minimum a maximum, 1. a 3. kvartil, medián a odľahlé hodnoty izotopovej analýzy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na rebier mužov a žien

12.6 Závislosť izotopových hodnôt na príslušnosti k rodine

Socioekonomický status jedincov vo vzorke sa líšil len malými odchýlkami. Súbor jedincov bol preto vymedzený na základe príbuzenských vzťahov a zdieľaných domácností, a to do šiestich rodín (viď Tab. 12.13). Priemerné izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ každej z rodín sú zobrazené v Tab. 12.14. Skúmané boli izotopové rozdiely $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v stehennej kosti aj rebre medzi týmito rodinami. Použili sme test ANOVA, ktorého predpokladom je normálne rozdelenie dát vo všetkých sledovaných súboroch. Overenie normality bolo vykonané pomocou Shapiro-Wilkovho testu, ktorý preukázal normálne rozdelenie vo všetkých skupinách (viď Tab. 12.15). Z dôvodu malého počtu vzoriek (menej než 3) nebolo možné overiť normálne

rozloženie dát na rebrách v 1. a 6. rodine. Z rovnakého dôvodu sme sa rozhodli otestovať vplyv príslušnosti k rodine v rebrách dvoma spôsobmi – v prvom kroku sme do ANOVA testu vložili všetkých 6 rodín, v druhom kroku sme vyradili rodiny s malým počtom jedincov, čiže rodinu 1 a 6. ANOVA zaznamenala signifikantný rozdiel medzi rodinami v prípade hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí (viď Tab.12.16 a Graf 12.18 a 12.19). Na grafickom znázornení krabicovými grafmi vidieť, že 1. rodina sa výrazne odlišuje svojimi hodnotami dusíka od všetkých ostatných rodín. ANOVA test nezistil signifikantný rozdiel v rebrách ani u jedného izotopu.

Tab. 12.13: Rozdelenie skúmaných stehenných kostí (n=45) a rebier (n=32) do príslušných rodín (1.-6. rodina)

stehenná kosť						rebro					
1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
39	1	7	22	28	46	43	1	7	22	28	48
40	2	8	23	30	47		2	8	23	30	49
41	3	9	24	31	48		3	9	24	31	
43	4	10	25	32	49		5	10	25	34	
	5	11	26	33			6	11		35	
	6	12	27	34			38	13		36	
	38	13		35				15		37	
		14		36				16			
		15		37				17			
		16						19			
		17						20			
		18						21			
		19									
		20									
		21									

Tab. 12.14: Priemerné hodnoty a SD izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí a rebier každej z rodín. Rodina č. 1 bola u rebier zastúpená jedinou vzorkou, preto k nej nie je vynesená SD.

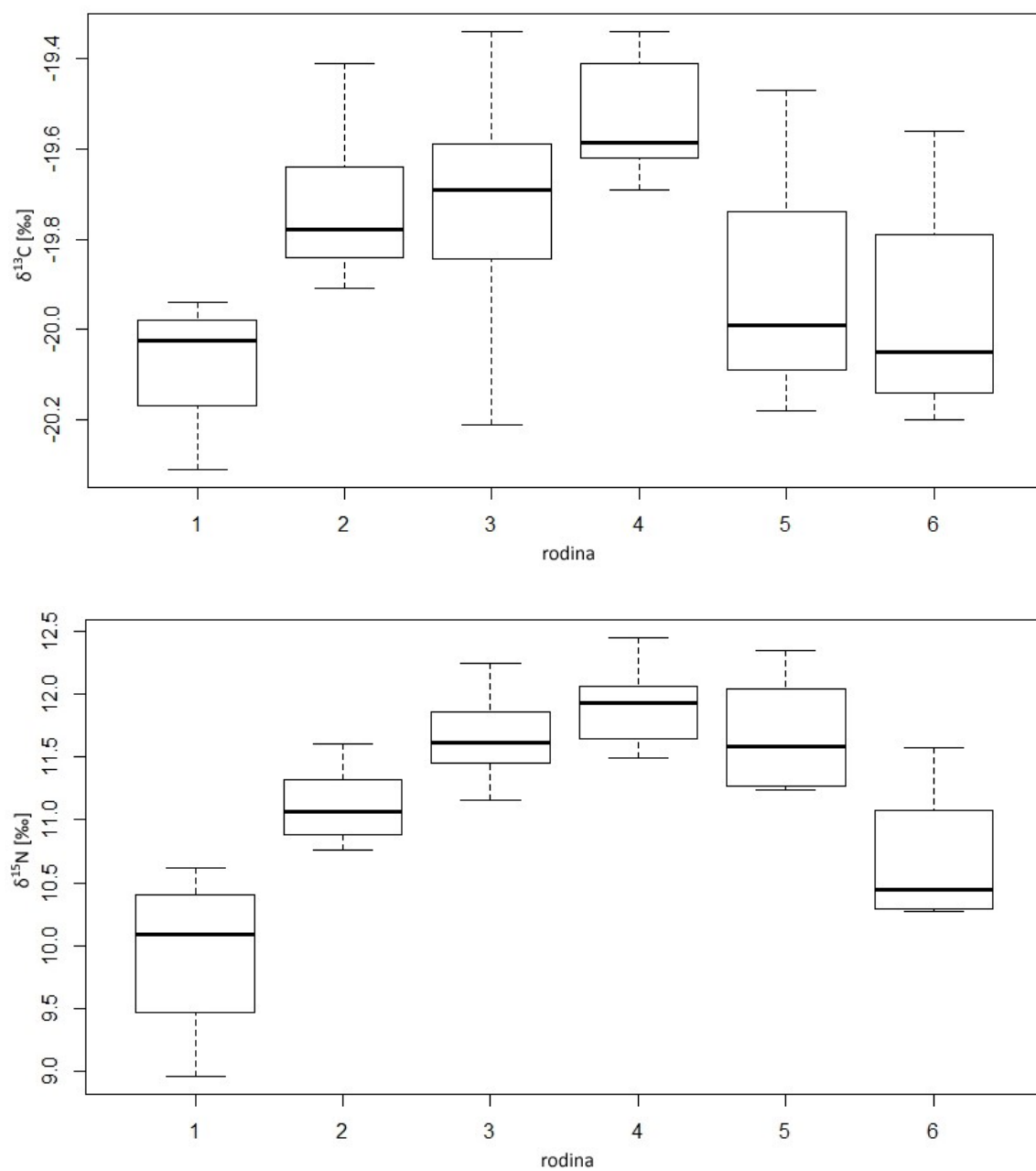
rodina	stehenná kosť		rebro	
	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]
1	-20,08 ($\pm 0,16$)	9,93 ($\pm 0,70$)	-20,20	10,45
2	-19,72 ($\pm 0,17$)	11,12 ($\pm 0,30$)	-19,66 ($\pm 0,20$)	11,47 ($\pm 0,38$)
3	-19,72 ($\pm 0,22$)	11,65 ($\pm 0,32$)	-19,71 ($\pm 0,15$)	11,78 ($\pm 0,53$)
4	-19,54 ($\pm 0,13$)	11,92 ($\pm 0,33$)	-19,31 ($\pm 0,45$)	12,39 ($\pm 0,35$)
5	-19,89 ($\pm 0,25$)	11,68 ($\pm 0,44$)	-19,94 ($\pm 0,22$)	11,95 ($\pm 0,58$)
6	-19,97 ($\pm 0,28$)	10,68 ($\pm 0,60$)	-19,90 ($\pm 0,27$)	11,38 ($\pm 0,74$)

Tab. 12.15: P-hodnoty Shapiro-Wilkovho testu normality pre všetky pozorované skupiny (6. rodín, obe kosti a izotopy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$)

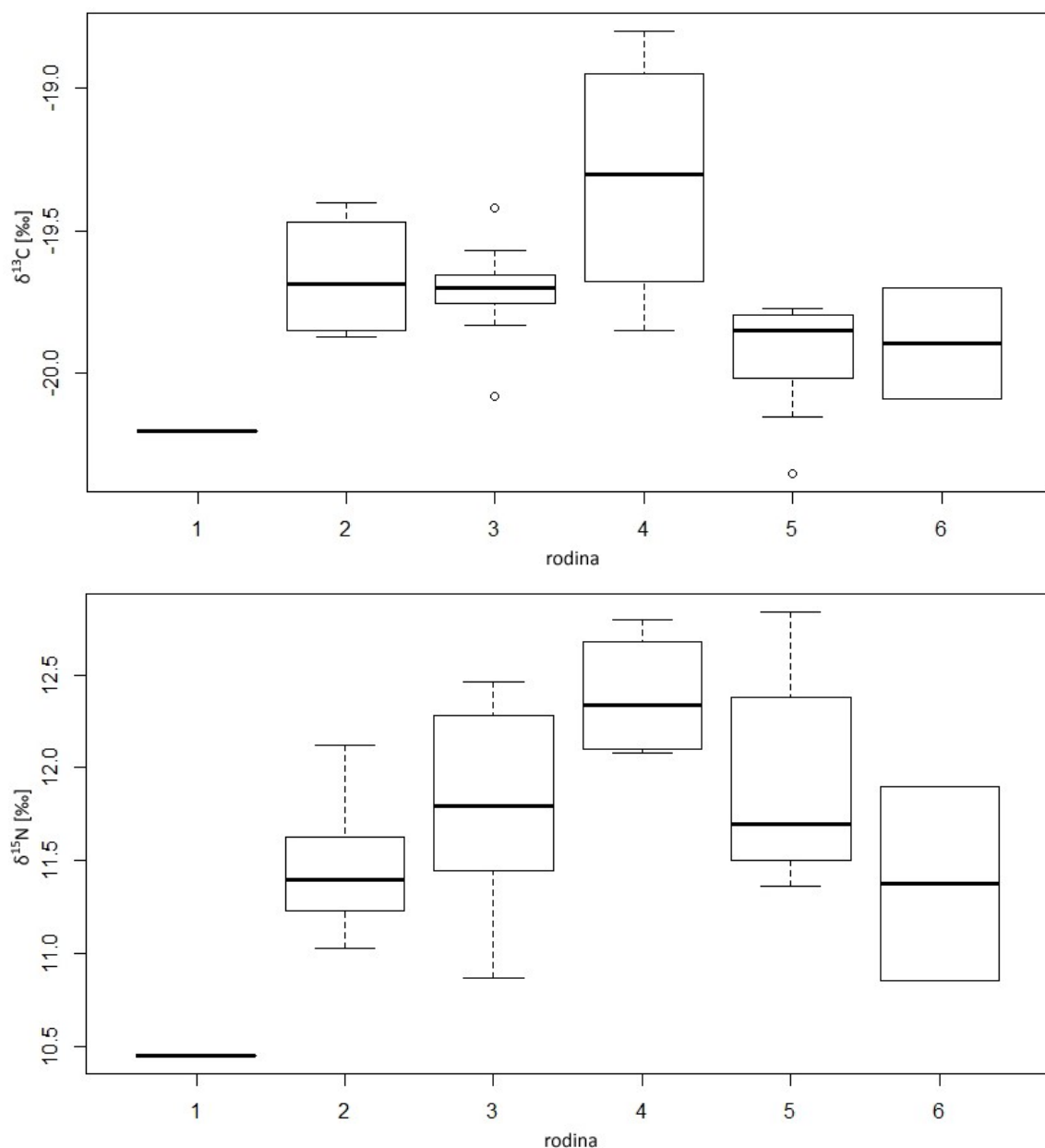
rodina	stehenná kosť		rebro	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
1.	0,1799	0,5932	-	-
2.	0,5477	0,6485	0,3265	0,7079
3	0,9056	0,7505	0,1787	0,35
4	0,4366	0,9257	0,92	0,3453
5	0,3413	0,103	0,06048	0,288
6	0,2574	0,09413	-	-

Tab. 12.16: P-hodnoty testu ANOVA pre stehennú kosť a rebro. Zvýraznená hodnota poukazuje na signifikantný vzťah medzi izotopovými hodnotami a príslušnosťou k rodine.

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,758
	$\delta^{15}\text{N}$	0,0354
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,417
	$\delta^{15}\text{N}$	0,101

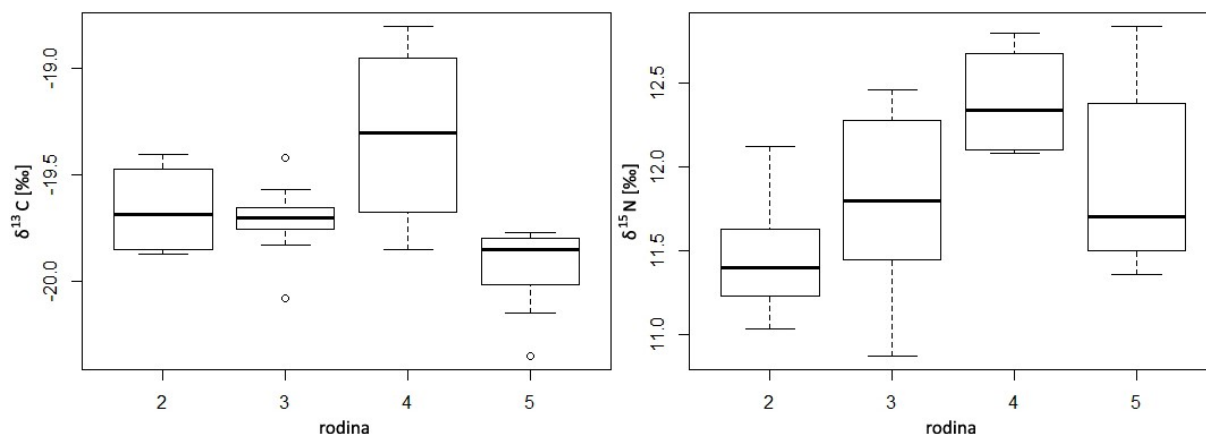


Graf 12.18: Krabicové grafy zobrazujú rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí medzi jednotlivými rodinami



Graf 12.19: Krabicové grafy zobrazujú rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier medzi jednotlivými rodinami

Z testovania izotopových rozdielov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier sme následne vyradili rodiny s nízkym počtom vzoriek, a to rodinu 1 (1 vzorka) a 6 (dve vzorky). Na ostávajúce štyri rodiny č. 2-5 bol opäť použitý ANOVA test, ktorého nové p-hodnoty boli 0,227 pre $\delta^{13}\text{C}$ a 0,057 pre $\delta^{15}\text{N}$. P-hodnota dusíku je na hranici signifikancie, a teda blízko pozorovaného rozdielu v stehenných kostiach. Rozdiely v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier štyroch rodín sú zobrazené na Graf 12.20.



Graf 12.20: Krabicové grafy zobrazujú rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier medzi rodinami 2-5

12.7 Závislosť izotopových hodnôt na zdravotnom stave

Vzorku skúmaných jedincov sme rozdelili do šiestich skupín podľa príčiny úmrtia a závažných ochorení, ktoré smrti jedinca predchádzali (viď Tab. 12.17). Najčastejšou príčinou úmrtia bolo karcinogénne ochorenie, ďalej mozgovo-cievna príhoda, tuberkulóza, opotrebovanie organizmu spojené s vyšším vekom jedinca a srdcové vady. Ostatné diagnózy postihli len malý počet jedincov, spojili sme ich preto do skupiny „iné“. Do tejto skupiny sme zaradili aj jedincov s neznámou príčinou úmrtia. Priemerné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ patologických skupín sú zobrazené v Tab. 12.18. Skúmali sme zmenu izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v oboch kostiach. Na testovanie sme použili ANOVA test. Pred samotným testom sme overili normálne rozdelenie dát pomocou Shapiro-Wilkovho testu (viď Tab. 12.19). Rozdelenie sa vo všetkých skupinách preukázalo ako normálne. Skupinu „srdcové vady“ na rebrách nebolo možné testovať Shapiro-Wilkovým testom, kvôli malému počtu vzoriek v skupine. V izotopových pomeroch $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ testom ANOVA nebola preukázaná závislosť na konkrétnej príčine úmrtia ani v jednom type skúmanej kosti (viď Tab. 12.20 a Graf 12.21 s 12.22). Niektoré skupiny ochorení tvoril len veľmi malý počet vzoriek, napríklad skupina „srdcovo-cievne ochorenie“ bola v prípade rebrových kostí zastúpená len dvomi vzorkami. K vizualizácii testov poslúžili krabicové grafy, na ktorých možno pozorovať odľahlé hodnoty hneď v niekoľkých kategóriách. Tieto odchýlky a ich možné príčiny sú interpretované v kapitole Diskusia.

Tab. 12.17: Najčastejšie príčiny úmrtia s počtom jedincov, ktorí danému ochoreniu podľahli a ich percentuálne zloženie v súbore

príčina úmrtia	stehenná kosť		rebro	
	počet jedincov	percentuálne zloženie	počet jedincov	percentuálne zloženie
srdcovo-cievne ochorenie	5	11 %	2	6 %
tuberkulóza	6	13 %	6	19 %
opotrebovanie organizmu vekom	6	13 %	4	12,5 %
mŕtvica	7	16 %	4	12,5 %
rakovina	8	18 %	8	25 %
iné	13	29 %	8	25 %

Tab. 12.18: Priemerné hodnoty a SD izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí a rebier patologických skupín

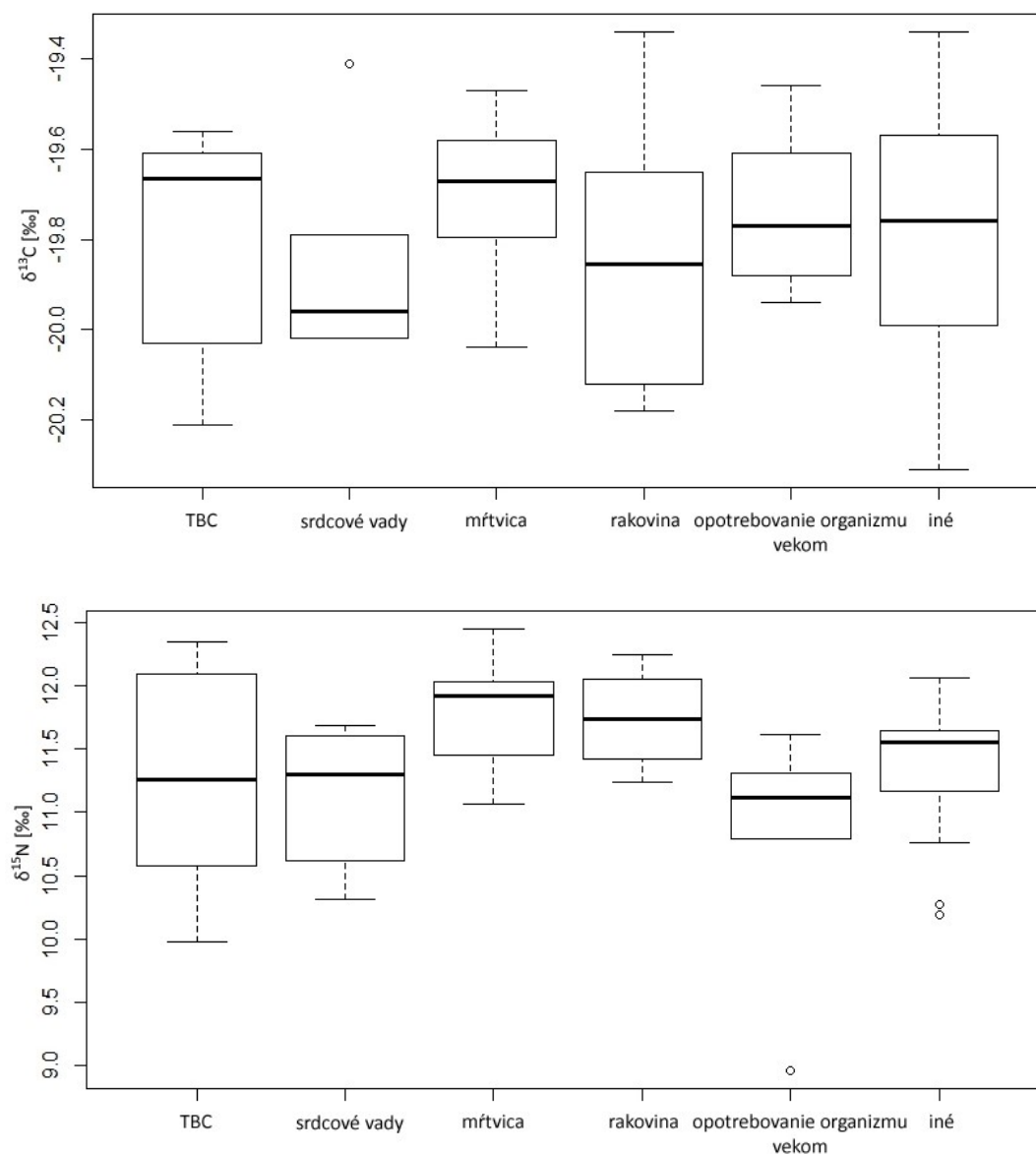
príčina úmrtia	stehenná kosť		rebro	
	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]
TBC	-19,79 ($\pm 0,26$)	11,25 ($\pm 0,89$)	-19,86 ($\pm 0,22$)	11,49 ($\pm 0,94$)
srdcové vady	-19,84 ($\pm 0,25$)	11,10 ($\pm 0,61$)	-19,97 ($\pm 0,16$)	11,70 ($\pm 0,02$)
mŕtvica	-19,71 ($\pm 0,20$)	11,77 ($\pm 0,47$)	-19,91 ($\pm 0,20$)	11,48 ($\pm 0,52$)
rakovina	-19,85 ($\pm 0,30$)	11,74 ($\pm 0,38$)	-19,89 ($\pm 0,43$)	11,43 ($\pm 0,53$)
opotrebovanie organizmu vekom	-19,74 ($\pm 0,17$)	11,82 ($\pm 0,95$)	-19,91 ($\pm 0,21$)	11,52 ($\pm 0,25$)
iné	-19,79 ($\pm 0,29$)	11,34 ($\pm 0,60$)	-19,94 ($\pm 0,33$)	11,35 ($\pm 0,42$)

Tab. 12.19: P-hodnoty Shapiro-Wilkovho testu normality pre patologické skupiny

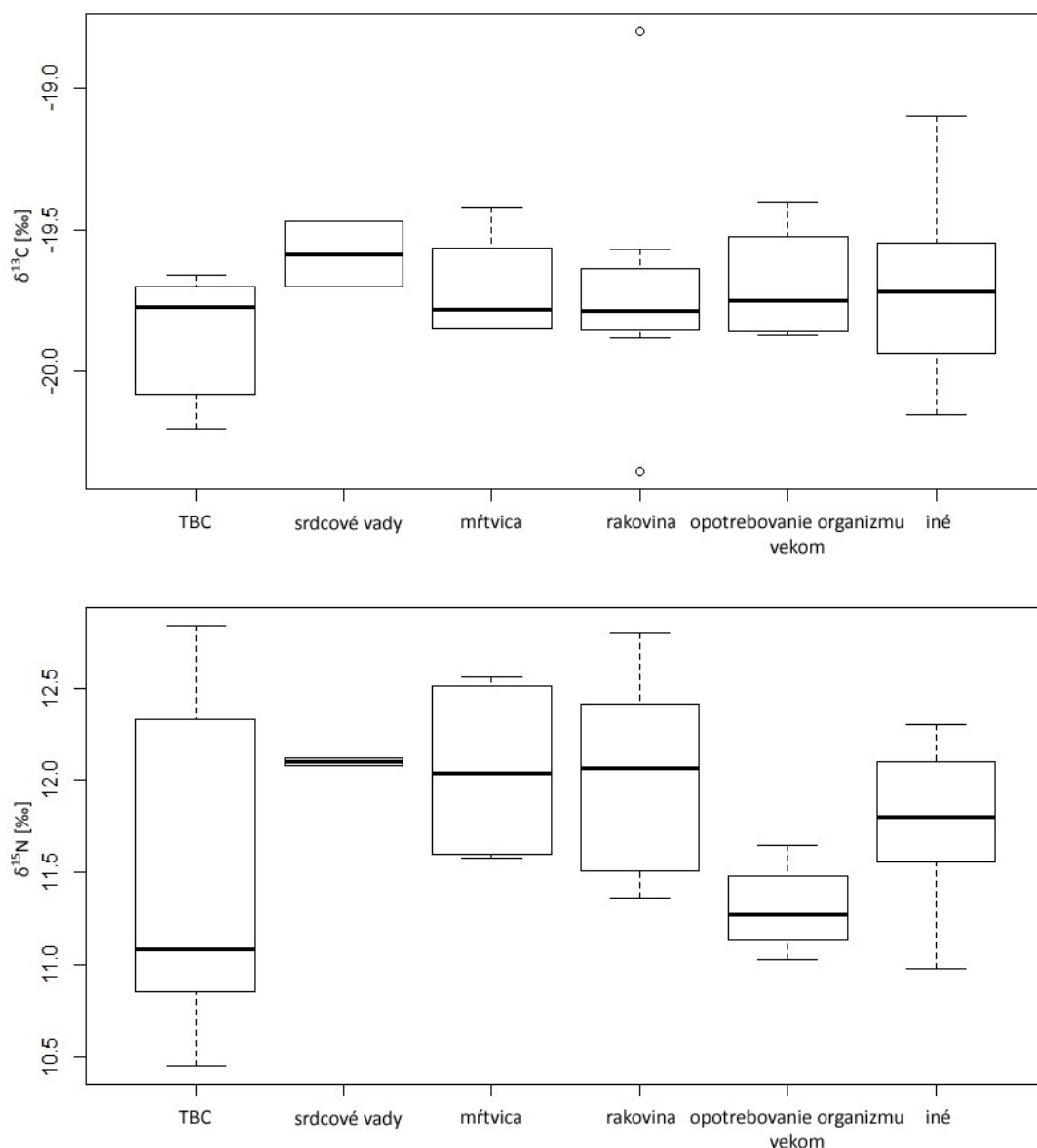
príčina úmrtia	stehenná kosť		rebro	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
TBC	0,1067	0,9638	0,1535	0,3456
srdcové vady	0,0765	0,3665	-	-
mŕtvica	0,5544	0,8425	0,1539	0,0904
rakovina	0,5004	0,4462	0,1114	0,6217
opotrebovanie organizmu vekom	0,8067	0,3372	0,3538	0,8038
iné	0,8873	0,0801	0,7265	0,7451

Tab. 12.20: P-hodnoty testu ANOVA pre stehennú kosť a rebro

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,919
	$\delta^{15}\text{N}$	0,808
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,46
	$\delta^{15}\text{N}$	0,787



Graf 12.21: Rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí vzhľadom na určitú patológiu



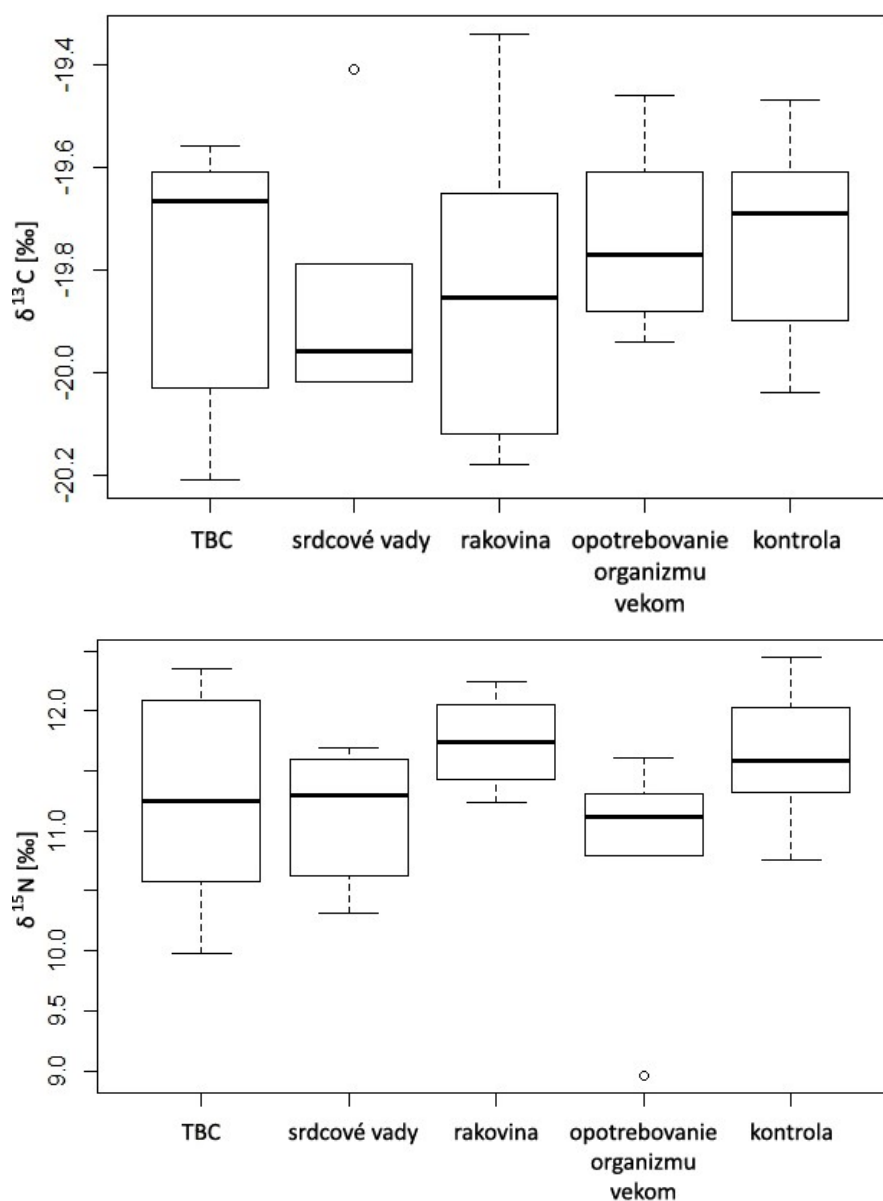
Graf 12.22: Rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier vzhľadom na určitú patológiu

Druhá časť sledovania vplyvu zdravotného stavu na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ spočívala vo vytvorení kontrolnej skupiny jedincov bez chronického ochorenia. Zaradili sa do nej jedinci, ktorí umreli na mŕtvicu a dvaja jedinci z predchádzajúcej skupiny „iné“, konkrétne jedinec č. 5, ktorý umrel na násilnú smrť zastrelením a jedinec č. 6, ktorého príčinou úmrtia bola autonehoda. Všetkých jedincov v tejto skupine ($n = 9$ pre stehenné kosti a $n = 6$ pre rebrá) spája náhle úmrtie, bez dlhodobého zhoršovania sa zdravotného stavu. Ďalšie skupiny zostali nezmenené, išlo o skupinu TBC, srdcové vady, rakovina a opotrebovanie organizmu vekom. Skupina „iné“ bola z testovania vyradená. Na sledovanie rozdielov medzi skupinou jedincov, ktorí zomreli náhle a skupinami jedincov, ktorých príčinou úmrtia bolo nejaké zo spomenutých

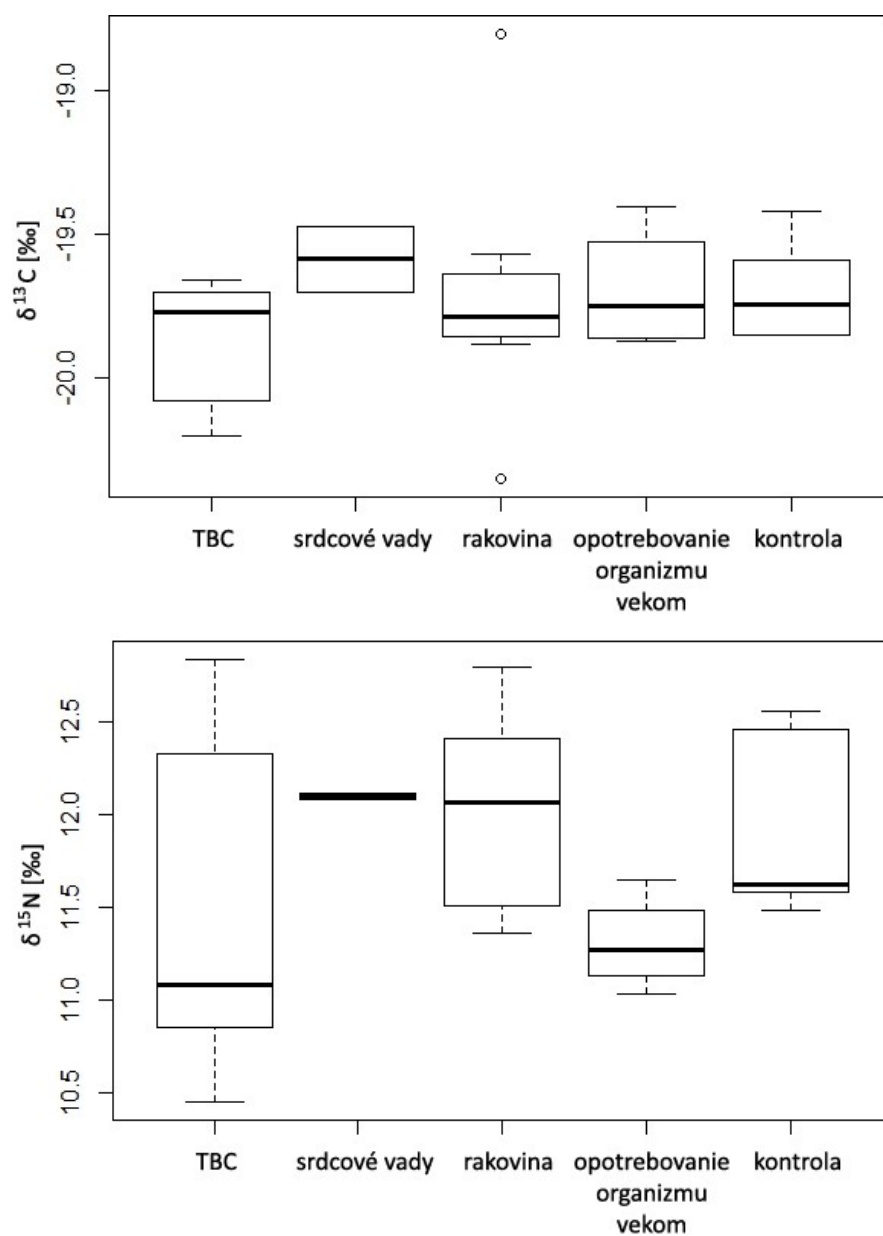
chronických ochorení bol použitý ANOVA test. Test nepreukázal signifikantný rozdiel ani v jednom prípade (viď Tab. 12.21 a Graf 12.23 a 12.24).

Tab. 12.21: P-hodnoty testu ANOVA pre stehennú kosť a rebro

	p-hodnota	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,439
	$\delta^{15}\text{N}$	0,533
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,395
	$\delta^{15}\text{N}$	0,545



Graf 12.23: Rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí medzi chronickými ochoreniami a kontrolou



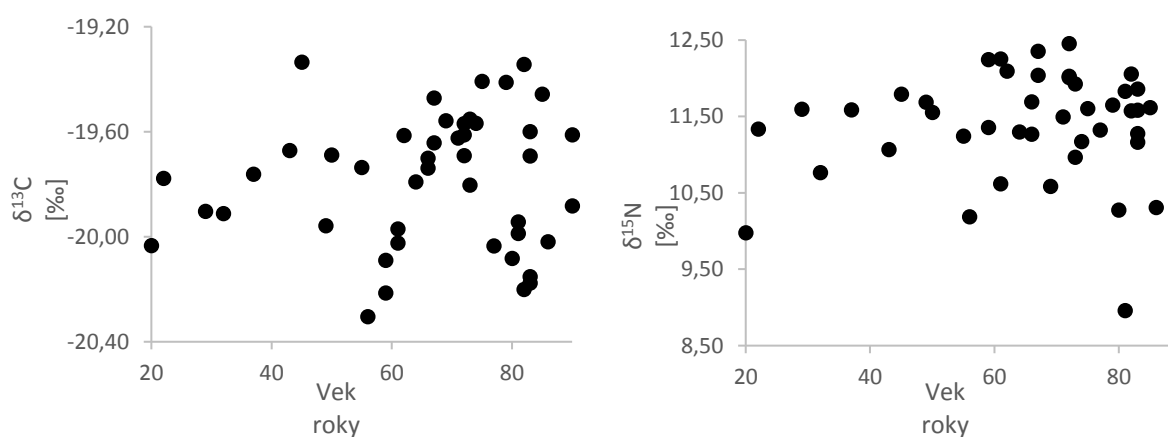
Graf 12.24: Rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier medzi chronickými ochoreniami a kontrolou

12.8 Závislosť izotopových hodnôt na veku dožitia

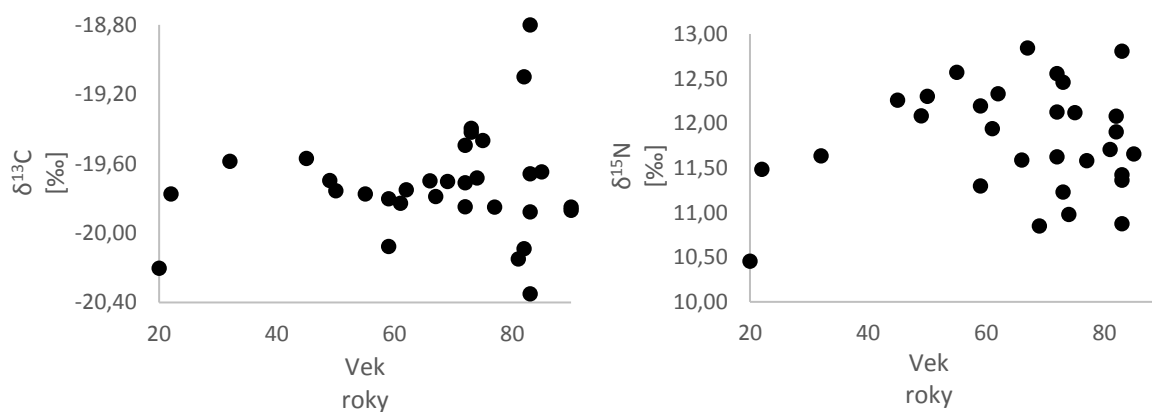
Ku každému jedincovi máme presný vek dožitia, preto sme súbor nerozdelili do vekových skupín, ale pracovali s konkrétnym rokom. Závislosť hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na veku bola testovaná Pearsonovým korelačným testom zvlášť pre rebro a stehennú kosť. Nepodarilo sa nám zistiť žiadnu koreláciu medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ a vekom dožitia jedinca, ani v jednej z analyzovaných kostí (viď Tab. 12.22 a Graf 12.25 a 12.26).

Tab. 12.22: P-hodnoty Pearsonovho korelačného testu závislosti izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na veku dožitia jedinca

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,5274
	$\delta^{15}\text{N}$	0,734
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,4498
	$\delta^{15}\text{N}$	0,9118



Graf 12.25: Zobrazuje závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na veku jedinca na stehenných kostiach



Graf 12.26: Zobrazuje závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na veku jedinca na rebrách

Súbor jedincov bol následne rozdelený do dvoch vekových kategórií, a to adultus + maturus (vekové rozpätie skupiny je 20-59 rokov) a senilis (60 rokov a viac), ku ktorým boli vynesené priemerné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ (viď Tab. 12.23). Rozdiely v izotopových hodnotách medzi vekovými kategóriami sa opäť nijak nepreukázali.

Tab. 12.23: Priemerné hodnoty a SD izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí a rebier dvoch vekových kategórií

kategória	priemerná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	priemerná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ [‰]
stehenná kosť 20-59 rokov	-19,88 ($\pm 0,25$)	11,26 ($\pm 0,63$)
stehenná kosť 60-90 rokov	-19,75 ($\pm 0,24$)	11,42 ($\pm 0,72$)
rebro 20-59 rokov	-19,81 ($\pm 0,20$)	11,81 ($\pm 0,66$)
rebro 60-90 rokov	-19,70 ($\pm 0,32$)	11,75 ($\pm 0,59$)

12.9 Závislosť izotopových hodnôt na počte pôrodov a počte rokov od posledného pôrodu

Pri skúmaní tejto závislosti sme do vzorky zaradili kostné vzorky všetkých žien (n=17), okrem vzorky č. 47, ku ktorej nemáme presný počet pôrodov zdokumentovaný, i keď vieme, že rodila niekoľkokrát. Vzorky sú v Tab. 12.24, zoradené podľa počtu pôrodov. Podrobené boli Pearsonovmu korelačnému testu, kde sme sledovali závislosť izotopových hodnôt uhlíka a dusíka na počte pôrodov. Test nepreukázal koreláciu medzi izotopovými hodnotami uhlíka ani dusíka na počte pôrodov žien (viď Tab. 12.25 a Graf 12.27 a 12.28).

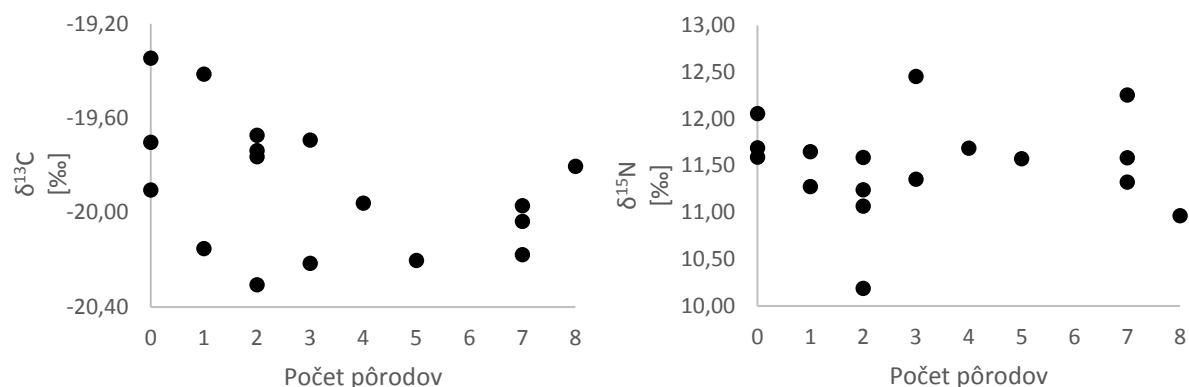
Tab. 12.24: Číslo vzorky spolu s počtom pôrodov ženy

vzorka	12*	16	24	27*	37	4*	14*	28	40*	10	23	17	49	8	31	34	2
počet pôrodov	0	0	0	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5	7	7	7	8

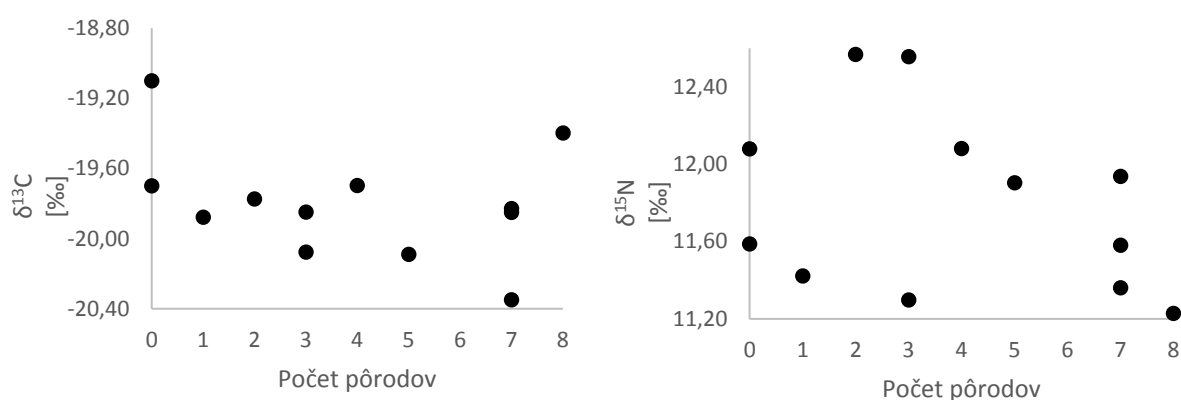
*ženy, u ktorých nebola analyzovaná rebrová kosť, výskum prebiehal len na stehennej kosti

Tab. 12.25: P-hodnoty Pearsonovho korelačného testu závislosti medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na počte pôrodov

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,09685
	$\delta^{15}\text{N}$	0,9761
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,3105
	$\delta^{15}\text{N}$	0,3117



Graf 12.27: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí na počte pôrodov ženy



Graf 12.28: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier na počte pôrodov ženy

Pri sledovaní závislosti izotopových hodnôt na počte rokov od posledného pôrodu ženy sme vynechali zo vzorky 3 ženy, ktoré počas života nerodili ani raz a ďalej sme pracovali so štrnástimi vzorkami. Vzorky sme zoradili podľa počtu rokov od posledného pôrodu, pričom ženy, ktoré umreli po poslednom pôrode s najmenším časovým rozstupom, mali medzi týmito udalosťami 9 rokov (č. 14 a 17), najväčší časový rozstup mala vzorka č. 37 s počtom rokov 60 (viď Tab. 12.26). Opäť sme použili Pearsonov korelačný test. Test nepreukázal závislosť ani v jednom zo skúmaných faktorov (viď Tab. 12.27 a Graf 12.29 a 12.30).

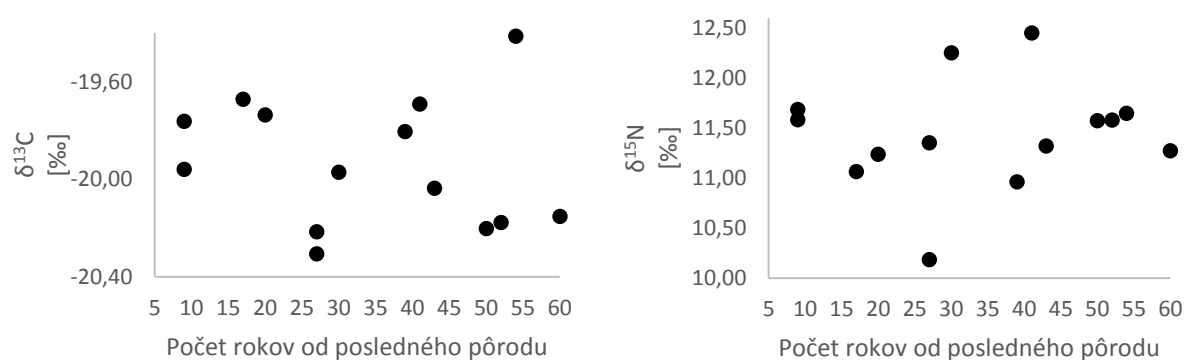
Tab. 12.26: Číslo vzorky spolu s počtom rokov od posledného pôrodu do roku úmrtia ženy

vzorka	14*	17	4*	28	10	40*	8	2	23	31	49	34	27*	37
počet rokov od posledného pôrodu	9	9	17	20	27	27	30	39	41	43	50	52	54	60

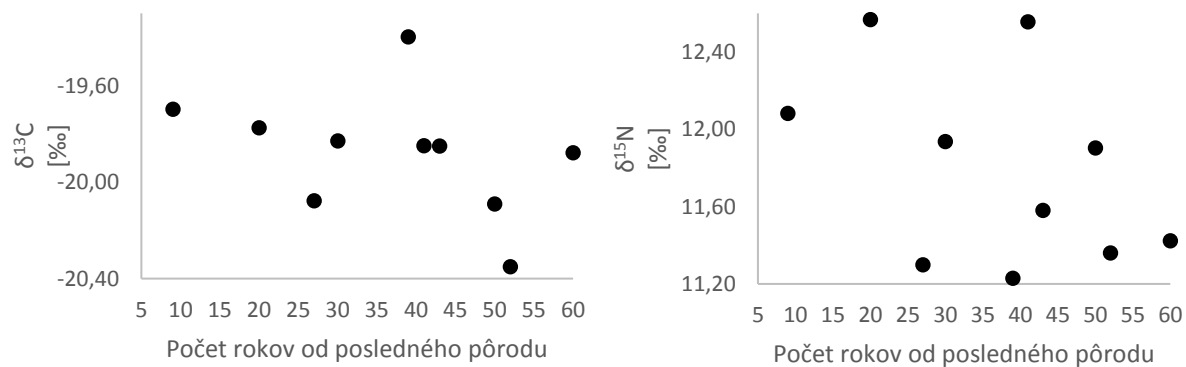
*ženy, u ktorých nebola analyzovaná rebrová kosť, výskum prebiehal len na stehennej kosti

Tab. 12.27: P-hodnoty Pearsonovho korelačného testu závislosti medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na počte rokov od posledného pôrodu

p-hodnota		
Stehenná kosť	$\delta^{13}\text{C}$	0,6092
	$\delta^{15}\text{N}$	0,7042
Rebro	$\delta^{13}\text{C}$	0,2729
	$\delta^{15}\text{N}$	0,2119



Graf 12.29: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí na počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím ženy



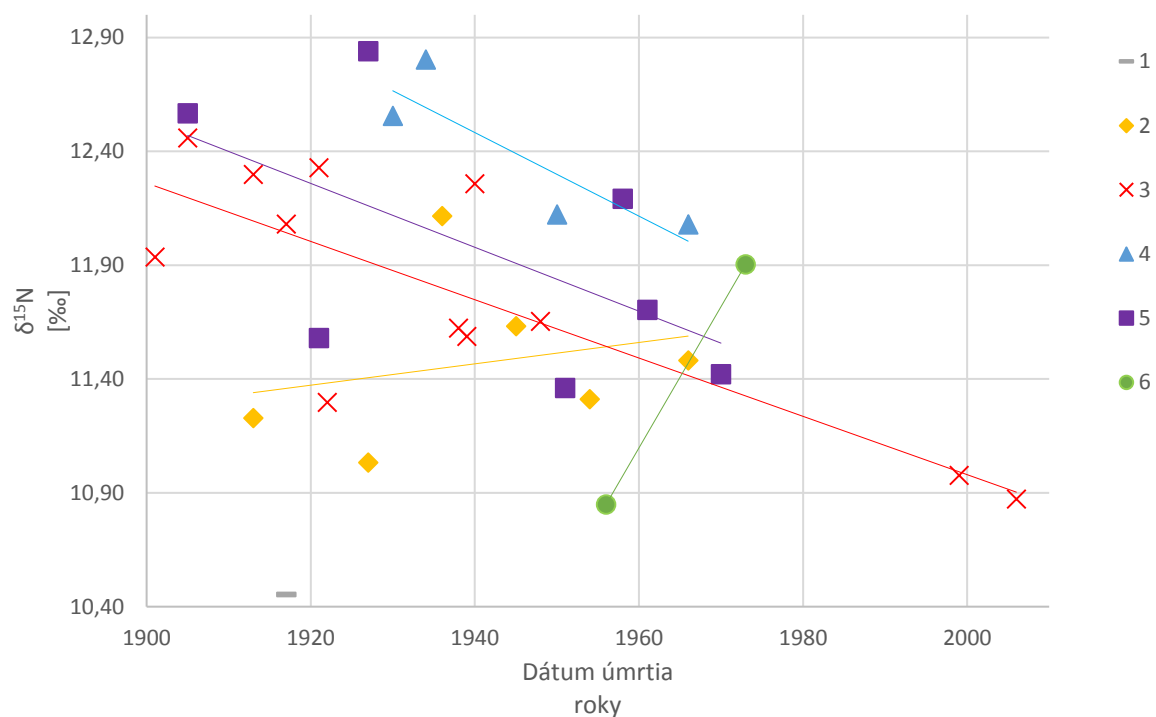
Graf 12.30: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebier na počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím ženy.

12.10 Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na piatich premenných

Lineárnou regresnou analýzou bola testovaná závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na pohlaví, veku dožitia, dátumu úmrtia, príslušnosti k rodine a zdravotnou stave. Súčasťou tohto testu bol základný lineárny model a následná ANOVA (typ 3). Postupným vyradovaním nezávislých premenných s najvyššou p-hodnotou vyššou než 0,05 ostali v konečnom modeli len premenné s nižšími p-hodnotami ako 0,05, a teda s významným vplyvom na izotopové hodnoty. Lineárny model bol vytvorený zvlášť pre izotopy $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$, vždy pre stehennú kosť i rebro. Na základe konečných p-hodnôt každej z nezávislých premenných je možné posúdiť, ktoré faktory majú významný vplyv na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$. V prípade stehenných kostí bola zaznamenaná korelácia len v jednom faktore (pohlavie) pre $\delta^{13}\text{C}$ a jednom faktore (príslušnosť k rodine) pre $\delta^{15}\text{N}$. Pre izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ v rebrách nebola pozorovaná závislosť ani na jednom zo sledovaných faktorov, ale pre $\delta^{15}\text{N}$ v rebrách bola pozorovaná závislosť na dátume úmrtia jedinca, a zároveň na príslušnosti k rodine (vid' Tab. 12.28). Oba faktory boli vynesené do grafu (vid' Graf 12.31) spolu s izotopovými hodnotami $\delta^{15}\text{N}$.

Tab. 12.28: Konečné p-hodnoty závislosti závislých premenných ($\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$) na nezávislých premenných, zvýraznené hodnoty predstavujú signifikantnú závislosť

nezávislá premenná	stehenná kosť		rebro	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
pohlavie	0,01829	0,73956	0,3016	0,223249
vek dožitia	0,74454	0,49796	0,3657	0,938577
dátum úmrtia	0,42297	0,5707	0,4969584	0,0071192
rodina	0,7146	0,03537	0,494819	0,0197863
zdravotný stav	0,96136	0,76015	0,395159	0,200676



Graf 12.31: Závislosť izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v rebre na dátume úmrtia jedincov, a zároveň príslušnosti k rodine, jednotlivé rodiny (1-6) sú odlišené farebne a značkou podľa legendy, na základe farebných rozdielov sú vynesené príslušne spojnice trendu

13 Diskusia

V diplomovej práci bola vykonaná izotopová analýza izotopov uhlíka a dusíka na jedincoch so známou osteobiografickou dokumentáciou. K tomuto súboru jedincov boli doložené všetky biologické informácie (vek, pohlavie), socioekonomické, patofyziologické (zdravotný stav počas života i príčina úmrtia) či príbuzenské. Cieľom práce bolo posúdiť vplyv týchto faktorov na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne rebier a stehenných kostí sledovaného súboru jedincov. Jedná sa o prácu na pomerne recentnom súbore jedincov. K jedincom, u ktorých bola uskutočnená zdravotná pitva, boli doložené pitevné protokoly s informáciami o výživovom stave v čase úmrtia, a tiež stave jeho kostného, svalového a tukového tkaniva, spolu so stavom orgánov tráviacej sústavy. Vďaka týmto informáciám, možno sledovať osteobiografický záznam konkrétneho jedinca a jeho vplyv na izotopové pomery.

Diskusia je rozdelená do podkapitol, kde sa prvá kapitola zaoberá izotopovou analýzou ľudských vzoriek spolu so zvieracími referenčnými vzorkami z rovnakého obdobia a regiónu. Ostatné kapitoly sú venované výhradne ľudským vzorkám a vplyvom odlišných faktorov na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne.

13.1 Analýza zvieracích a ľudských vzoriek

Izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ($\bar{x} = -20,49 \pm 1,91 \text{ ‰}$) fauny z lokality Stredočeského kraja zodpovedajú ekosystému C3 rastlín, ktorý je typický pre územie strednej Európy (Schoeninger & DeNiro 1984; Van Der Merwe 1982; Sealy & Van Der Merwe 1986). Jedinou výnimkou je výrazne vyššia hodnota $\delta^{13}\text{C}$ u tura ($-15,99 \text{ ‰}$) by mohla byť vysvetlená vyšším podielom C4 rastlín v jeho výžive, čo nie je vzhľadom na lokalitu pravdepodobné (Van Der Merwe, 1982; Sealy & Van Der Merwe, 1986).

Izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ pre ľudské vzorky ležia v rozmedzí $-20,31$ – $-19,34 \text{ ‰}$ ($\bar{x} = -19,78 \pm 0,253 \text{ ‰}$, $n = 45$) pre stehenné kosti a v rozmedzí $-20,35$ – $-18,80 \text{ ‰}$ ($\bar{x} = -19,73 \pm 0,300 \text{ ‰}$, $n = 32$) pre rebrá. Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ ľudských vzoriek sú v intervale $8,96$ – $12,45 \text{ ‰}$ ($\bar{x} = 11,37 \pm 0,695 \text{ ‰}$, $n = 45$) pre stehenné kosti a v intervale $10,45$ – $12,84 \text{ ‰}$ ($\bar{x} = 11,77 \pm 0,602 \text{ ‰}$, $n = 32$) pre rebrá. Výsledky sú v súlade s prácami, ktoré sledovali rozdiely medzi ľudskými a zvieracími vzorkami z 15. storočia Anglicka (rozdiel v $\delta^{13}\text{C}$ je 1 ‰ , v $\delta^{15}\text{N}$ 3 – 4 ‰ , Müldner & Richards 2007), a takisto zodpovedajú hodnotám ľudských vzoriek v populácii Kanady 19. storočia ($\delta^{13}\text{C} = -19,5 \pm 0,8 \text{ ‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 12,7 \pm 1,1 \text{ ‰}$, Katzenberg & Pfeiffer 1995),

Kodani 19.-20. storočia ($\delta^{13}\text{C} - -19,2 \pm 0,5 \text{ ‰}$ a $\delta^{15}\text{N} - 13,2 \pm 0,4 \text{ ‰}$, Jørkov & Gröcke 2016) a Prahy 11.-18. storočia ($\delta^{13}\text{C} - -19,7 \pm 0,5 \text{ ‰}$ a $\delta^{15}\text{N} - 10,7 \pm 1,6$, Salesse et al. 2013).

Pri izotopovej analýze ľudských vzoriek je zvykom doložiť ako referenčný súbor vzorky rôznych druhov zvierat, ktoré s najväčšou pravdepodobnosťou tvorili zložku potravy týchto jedincov. Z dôvodu zmeny izotopových pomerov v čase a priestore, musí referenčný súbor pochádzať z rovnakého obdobia a lokality ako ľudský súbor (van Klinken et al. 2002). V diplomovej práci bol priemerný rozdiel medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ľudských stehenných kostí a zvieracích vzoriek 0,71 ‰, medzi hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ bol rozdiel približne 5,62 ‰, medzi rebrami a zvieracími vzorkami bol rozdiel 0,76 ‰ pre $\delta^{13}\text{C}$ a 6,02 ‰ pre $\delta^{15}\text{N}$. Rozdiely sú v súlade s nárastom $\delta^{13}\text{C}$ o 0-1 ‰ a nárastom $\delta^{15}\text{N}$ o 3-5 ‰, prípadne 6 ‰, medzi stravou a tkanivom konzumentov (O'Connell et al. 2012; Minagawa & Wada 1984; Schoeninger & DeNiro 1984; Post 2002; Webb et al. 2016).

Strava sledovaného súboru jedincov pochádzajúceho zo Stredočeského kraja, a presne datovaného medzi roky 1888-2006 (na základe úmrtí jedincov), bola primárne založená na C3 rastlinách s výrazným podielom živočíšnych bielkovín, ktorých zdrojom boli hospodárske zvieratá. Výrazné rozdiely medzi ľudskými a zvieracími vzorkami v hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ naznačujú značný podiel živočíšnych proteínov v strave. Podiel morských zdrojov v strave, ktorý by mohol spôsobiť zvýšenie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$, nebol zaznamenaný. Vylúčiť by sme mohli i významnú konzumáciu C4 rastlín, ktorá zvyšuje hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ešte výraznejšie (Van Der Merwe 1982; Sealy & Van Der Merwe 1986). Je nutné zohľadniť malý počet zvieracích vzoriek, tak ako medzidruhovú variabilitu i odlišnosti v izotopových hodnotách v rámci jedného druhu (Smith & Epstein 1971; Lee-Thorp et al. 1989).

13.2 Dátum úmrtia

Izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ sa menia v čase a priestore (van Klinken et al. 2002). Lokalita Stredočeského kraja, odkiaľ pochádza kompletný súbor jedincov, sa v priebehu posledných troch storočí zmenila, čo môže viesť k rôznym izotopovým hodnotám $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ medzi skôr a neskôr žijúcimi jedincami. Rozpätie na základe úmrtí jedincov je 1888-2006. Medzi environmentálne zmeny, ktoré sa v tomto období na území Českej republiky udiali, patrí veľký rozmach automobilového priemyslu, a s tým spojené spaľovanie fosílnych palív, ktoré znižuje $\delta^{13}\text{C}$ v ovzduší i organizmoch. U skôr žijúcich jedincov sa preto predpokladajú vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ako u neskôr žijúcich (Kellner & Schoeninger 2007; Marino & McElroy 1991). Ďalšiu zmenu životného prostredia mohlo spôsobiť postupné využívanie syntetických hnojív namiesto

živočíšnych, ktoré vedie k zníženiu hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v pôdach i organizmoch (Bateman & Kelly 2007).

V našom výskume sme sledovali závislosť izotopových pomerov $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ na roku úmrtia jedincov. V hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ nebol preukázaný žiadny rozdiel medzi skôr a neskôr žijúcimi jedincami. Na grafe Graf 12.8, ktorý zobrazuje závislosť hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ v rebrách, možno pozorovať dve výraznejšie odchýlky v hodnotách, a to jedinca č. 22, s hodnotou $\delta^{13}\text{C}$ -18,80 ‰, ktorý umrel v roku 1934 a jedinca č. 24 s hodnotou -19,10 ‰ a dátumom úmrtia 1966. Obaja jedinci majú výraznejšie vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ než zvyšné vzorky rebier, avšak nijak sa nevymykajú vzhľadom na dátum úmrtia. Navyše sa jedná o príbuzných jedincov vo vzťahu otec (č. 22) a dcéra (č. 24), ktorí sa vyznačovali veľmi zlým zdravotným stavom a trpeli závažnými chronickými ochoreniami. Skôr žijúci jedinci nášho súboru nemali vyššie izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v stehenných kostiach ani rebrách než neskôr žijúci, čo nepodporuje predchádzajúce výskumy na kostnom kolagéne a bioapatite (Kellner & Schoeninger 2007). Práce Francey et al. (1999) a Ferrio et al. (2005) naopak, preukázali zníženie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ počas posledných storočí, oba výskumy však pracovali s hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ v antarktických ľadovcoch. Práca Marino & McElroy (1991) zaznamenala vyššie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ u skôr rastúcich C4 rastlín. Počiatok industrializácie v 18. storočí a s ním súvisiaca výrazná zmena izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ (Kellner & Schoeninger 2007; Marino & McElroy 1991; Francey et al. 1999) predchádzala narodeniu všetkých jedincov v skúmanom súbore. Je možné, že v období vymedzenom na základe úmrtí jedincov, bola už izotopová zmena v ovzduší i organizmoch spomalená, a preto sa nemohla výrazne zapísať v pomaly remodelujúcom kostnom tkanive.

V testovaní rozdielov izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ v závislosti na dátume úmrtia jedinca sme pozorovali signifikantný rozdiel v stehenných kostiach (p-hodnota = 0,03272). V súbore jedincov sa nachádzali dvaja jedinci s výrazne odľahlými rokmi úmrtia oproti zvyšku súboru, a to jedinci č. 20 s dátumom úmrtia 1999 a č. 21, ktorý umrel v roku 2006 (viď Graf 12.13). Ostatní jedinci umreli medzi rokmi 1888-1973 bez výrazných odchýlok v rámci tohto intervalu. Ani jeden z jedincov nevykazoval odchýlku v rámci hodnôt $\delta^{15}\text{N}$, jedinec č. 20 pomer dusíka 11,17 ‰ a č. 21 11,16 ‰. Výsledok korelačného testu a vzniknutého vzťahu mohol byť zapríčinený odľahlými rokmi úmrtia práve spomínaných jedincov, čo potvrdilo aj ďalšie testovanie, z ktorého boli jedinci č. 20 a 21 vyradení. Nová p-hodnota testu bola 0,1001 a nevykazovala signifikantný rozdiel medzi jedincami. Izotopová analýza v rebrách taktiež nevykazovala žiadny rozdiel v hodnotách $\delta^{15}\text{N}$, čo nasvedčuje tomu, že dátum úmrtia nemá vplyv na izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$. Výsledky nepodporujú predchádzajúce závery práce

Bateman & Kelly (2007), ktorá pozorovala klesajúci trend v hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ obilnín smerom k súčasnosti, avšak je nutné zohľadniť aj pôvodnú pozorovanú koreláciu v stehenných kostiach. Vysvetlením tejto závislosti by mohla byť zmena prostredia v čase v podobe zvýšeného používania syntetických hnojív u neskôr žijúcich jedincov (Bateman & Kelly 2007).

Dátum úmrtia vykazoval spolu s príslušnosťou k rodine významný vplyv na izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ rebier pri testovaní piatich premenných v lineárnej regresnej analýze. Na grafe Graf 12.31 je viditeľné, že rodiny č. 3, 4 a 5 majú klesajúce hodnoty v závislosti na neskoršom dátume úmrtia. Rodiny č. 2 a 6 vykazujú opačný trend, ale sú aj menej početné. Rodina č. 1 bola v testovaní pomocou lineárneho modelu zastúpená jediným jedincom. To by mohlo znamenať, že jedinci z rodín 3, 4 a 5, ktorým sa v čase hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ znižovali, postupne prechádzali na hnojenie syntetickými hnojivami, čo by odpovedalo výsledkom práce Bateman & Kelly (2007). Výsledky súhlasia aj s informáciami, že tieto rodiny skutočne používali na hnojenie syntetické hnojivá, konkrétne chilský liadok (dusičnan sodný (osobná komunikácia s Mgr. Janom Cvrčkom).

13.3 Rozdiely izotopových pomerov medzi rôznym typom kostí rovnakého jedinca

Stehenná a rebrová kosť sa od seba odlišujú rôznou rýchlosťou remodelácie kostného tkaniva. Kostný kolagén sa v stehennej kosti dospelého človeka obmieňa pomalšie, tento čas presahuje výrazne 10 rokov, zatiaľ čo kolagén v rebre dospelého človeka potrebuje na svoju obmenu 5-10 rokov (Fahy et al. 2017; Lamb et al. 2014; Cox & Sealy 1997). Z tohto dôvodu sme predpokladali, že izotopové hodnoty v rebre môžu odrážať aj krátkodobé zmeny organizmu, ktoré môžu byť následkom zmeny v stravovaní alebo zhoršenia zdravotného stavu jedinca. Izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ medzi rebrami rôznych jedincov by mali vykazovať väčšiu variabilitu ako medzi stehennými kosťami a samotné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ sa môžu líšiť medzi rebrom a stehennou kosťou rovnakého jedinca.

Variabilita rozptylu medzi izotopovými hodnotami nepreukázala žiadny signifikantný rozdiel, ale na grafe Graf 12.15 možno pozorovať, že v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ rebier je niekoľko vzoriek s odľahlými hodnotami, ktoré rozptyl oproti hodnotám $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí mierne rozširujú. V prípade hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ tiež pozorujeme väčšie rozpätie hodnôt v rebrách, v prípade stehenných kostí pozorujeme jednu odľahlú hodnotu. Mierne vyššie rozptily pozorované vo vzorkách rebier potvrdzujú náš predpoklad, že v rýchlejšie remodelujúcich kostiach sa vo väčšej miere prejavujú krátkodobé vplyvy pôsobiace na organizmus človeka. V kostnom kolagéne rebier môže byť prejav patológií predchádzajúcich smrť jedinca výraznejší

(Fahy et al. 2017; Hedges et al. 2007; Lamb et al. 2014). Rozdiel medzi rozptylmi jednotlivých vzoriek však nie je signifikantný.

Signifikantný rozdiel medzi izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ rebra a stehennej kosti rovnakého jedinca sa nám nepodarilo preukázať. Vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ má 22 z 32 testovaných jedincov v rebrách. Priemerné hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ rebier sú o 0,23 ‰ vyššie než priemerné hodnoty stehenných kostí. Dôvodom je výraznejší rozdiel (viac ako 0,5 ‰) v izotopových hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ šiestich jedincov – č. 28, 22, 5, 15, 7 a 38, pričom jedinec č. 28 má hodnotu $\delta^{15}\text{N}$ v rebrách o 1,33 ‰ vyššiu než v stehennej kosti. Deväť jedincov zo súboru malo vyššie izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v stehenných kostiach, rozdiel bol u každého z nich menší než 0,4 ‰. Rozdiel v priemerných hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ medzi rebrami a stehennými kosťami rovnakých jedincov bol 0,04 ‰ s priemernou vyššou hodnotou v rebrách, avšak rozdiel bol skutočne veľmi malý. Pri posúdení hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ bol zaznamenaný rozdiel 0,8 ‰ u jedinca č. 22, s vyšším pomerom $\delta^{13}\text{C}$ v rebre. Tento jedinec mal výrazný rozdiel u oboch izotopov, ale zároveň je to jedinec, ktorý sa svojimi hodnotami vymyká oproti zvyšku súboru a bolo zvažované, či bude kvôli svojmu výrazne vyššiemu kolagénovému výťažku zaradený do ďalšieho testovania (viď vyššie). Interpretácia rozdielov v izotopových hodnotách pokračuje v diskusii v Kap. Zdravotný stav.

Predchádzajúce práce sa odlišujú vo svojich výsledkoch ohľadom rozdielov izotopových hodnôt medzi rôznym typom kostí v tele toho istého jedinca. Výsledky diplomovej práce nepodporili výskumy, v ktorých boli výrazné rozdiely v izotopových hodnotách rôznych kostí pozorované (Hedges et al. 2007; Lamb et al. 2014), ale naopak zodpovedajú výsledkom štúdií Fahy et al. (2017), Pollard et al. (2012) a Chenery et al. (2012), ktoré takisto preukázali mierne vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v rebrách, a tiež nevýraznú variabilitu izotopových hodnôt v rámci kostry jedného jedinca (Fahy et al. 2017). Z výsledkov diplomovej práce plynie, že v populácii sledovaného súboru nebola systematická zmena v stravovaní, ktorá by súvisela s určitou životnou etapou alebo s vekom jedinca, a nie je tak možné popísať spoločný fyziologický mechanizmus, ktorý by menil izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ alebo $\delta^{15}\text{N}$ pred smrťou rovnakým smerom (v archeologických populáciách napr. zvýšenie podielu C_4 rastlín vo výžive starších jedincov (Dreslerová & Hajnalová 2013)). Nie je však vylúčené, že sa zmeny nemohli vyskytovať na úrovni jednotlivcov či skupín (skupina jedincov s rovnakým ochorením, rodiny zdieľajúce jednu domácnosť atď.).

13.4 Pohlavie

Na základe záverov niekoľkých prác, ktoré pozorovali medzipohlavné rozdiely v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ (Kaupová et al. 2016; Vytlačil et al. 2018; Knipper et al. 2013; Fuller et al. 2006), sme sa rozhodli otestovať vplyv pohlavia aj v našej vzorke jedincov. Vzniknuté rozdiely medzi pohlaviami boli zapríčinené odlišnou stravou, predovšetkým z dôvodu vyššej konzumácie živočíšnych bielkovín mužmi (Kaupová et al. 2018, Vytlačil et al. 2018).

Súbor sme rozdelili podľa izotopu ($\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$), študovanej kosti (stehenná kosť/rebro) a pohlavia (muž/žena). Štatisticky signifikantný rozdiel medzi pohlaviami bol preukázaný len v prípade izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ v stehennej kosti (p-hodnota = 0,02658), kedy boli u mužov priemerné izotopové hodnoty zvýšené o 0,18 ‰ oproti hodnotám žien (viď Tab. 12.10). Rozdiel je vzhľadom k prirodzenej variabilite hodnôt pozorovanej v predchádzajúcich štúdiách (Knipper et al. 2013; Privat et al. 2002; Schutkowski et al. 1999) veľmi nízky. Lineárna regresná analýza taktiež zaznamenala vplyv pohlavia na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v stehenných kostiach (p-hodnota = 0,01829), v ostatných kategóriách vplyv pohlavia nebol pozorovaný, čím podporila výsledky predchádzajúceho Welchovho dvojvýberového t-testu.

Možným vysvetlením výsledkov v diplomovej práci môže byť odlišná strava medzi pohlaviami, ktorá bola v minulosti viackrát zaznamenaná. Práca Knipper et al. (2013) na nemeckej populácii z 5.-6. storočia pozorovala mierne znížené hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ u žien, čomu by zodpovedali aj výsledky tejto práce. Autori štúdie Fuller et al. (2006) taktiež odhalili nižšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ u žien. K rovnakému záveru došla i práca Kaupová et al. (2018) i Vytlačil et al. (2018). Príčinou rozdielov v študovanom súbore jedincov v tejto práci by mohol byť mierne odlišný podiel C3/C4 rastlín v strave, kedy by muži podľa vyšších hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ oproti ženám v oboch kostiach mohli mať stravu bohatšiu na C4 rastliny (proso alebo kukurica) než ženy (Smith & Epstein 1971; O'Leary 1981; Farquhar et al. 1989). To je vzhľadom na obdobie a lokalitu týchto jedincov, a faktu, že celý súbor jedincov boli navzájom príbuzní jedinci, ktorí zdieľali 6 spoločných domácností, nepravdepodobné. Ďalším vysvetlením by mohol byť rozdielny zdravotný stav (Welle 2012; Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press), ale jedinci sa navzájom svojimi diagnózami odlišovali. Preto je pravdepodobné, že zdravotný stav nevedol k vzniknutému rozdielu v hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ medzi pohlaviami.

Vplyv pohlavia nebol zaznamenaný v rýchlejšie remodelujúcich rebrách, čo spolu s malou veľkosťou súboru a malou veľkosťou rozdielu medzi pohlaviami v stehenných

kostiach naznačuje, že sa nejedná o biologicky významný rozdiel a faktor pohlavia nebude zohľadnený pri ďalšom testovaní.

13.5 Príslušnosť k rodine

Príslušnosť k určitej socioekonomickej skupine sa môže odraziť na izotopovom zázname kostného kolagénu jedinca (van der Veen 2003; Vytlačil et al. 2018; Kaupová et al. 2018). Vyššie socioekonomické vrstvy v minulosti využívali k zdôrazneniu svojho statusu predovšetkým potravné odlišnosti, napríklad v podobe konzumácie väčšieho množstva mäsa, čo viedlo k vyšším hodnotám $\delta^{15}\text{N}$, prípadne i $\delta^{13}\text{C}$ u jedincov s vyšším SES (Vytlačil et al. 2018; van der Veen 2003). U súčasnejších populácií by sa mohol vyšší sociálny status preukázať napríklad prostriedkami k lepšej zdravotnej starostlivosti, čím by sa u jedinca znižovalo riziko výskytu ochorení alebo by mali takíto jedinci možnosti ku kvalitnejšej liečbe ochorení. Na druhej strane, neadekvátne stravovanie, čo sa týka množstva a kvality, môže viesť k stavu nutričného stresu, ktorý sa vyznačuje znížením hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a opäť zvýšením $\delta^{15}\text{N}$ (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013).

Náš súbor z 19.-21. storočia sa na úrovni jednotlivcov odlišoval svojím sociálnym statusom len veľmi nevýrazne, preto sme súbor rozdelili na základe príbuznosti, zdieľanej domácnosti a charakteru povolania do šiestich rodín (viď Kap. Materiál). Toto vymedzenie nebolo nijak ostré, medzi rodinami prebiehalo stretávanie, a tým aj prekryv domácností. Nižším sociálnym statusom sa odlišovala len 1. rodina, ostatné boli takmer na rovnakej úrovni. Rodina č. 6 bola jedinou nepríbuznou rodinou, takže bola s ostatnými rodinami v najmenšom kontakte a odlišovala sa aj svojím sociálnym postavením a povolaním členov tejto rodiny. Sledovali sme vplyv príslušnosti k určitej rodine na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$. V prípade $\delta^{13}\text{C}$ nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel medzi týmito rodinami, a to ani v jednej z analyzovaných kostí. Pri zohľadnení priemerných izotopových hodnôt sme však zaznamenali najnižšiu priemernú hodnotu $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí v 1. rodine (-20,08 ‰) oproti ostatným rodinám (rozpätie hodnôt -19,97--19,54 ‰). Rodina s druhou najnižšou priemernou hodnotou (-19,97 ‰) je 6. rodina. V rebrách bola 1. rodina zastúpená len jedným jedincom, jeho hodnota $\delta^{13}\text{C}$ (-20,20 ‰) však bola opäť najnižšia zo všetkých rodín. Rozpätie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ 2.-6. rodiny bolo -19,90--19,31 ‰. Kvôli malému množstvu vzoriek rebier v 1. a 6. rodine, sme tieto dve rodiny z testovania následne vyradili a testovali rozdiely v sociálnom statuse 2.-5. rodiny. Výskum opätovne neodhalil signifikantný rozdiel v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ medzi štyrmi rodinami.

V izotopových hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ bol medzi rodinami zistený signifikantný rozdiel v stehenných kostiach (p-hodnota = 0,0354). Na grafe Graf 12.18 možno pozorovať, že najvýraznejšie sa v hodnotách $\delta^{15}\text{N}$ odlišuje 1. rodina, a to nižšími výrazne hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ (9,93 ‰) než majú rodina č. 2-6. Druhou poradí je opäť 6. rodina s priemernou hodnotou $\delta^{15}\text{N}$ 10,68 ‰. Ostatné rodiny majú rozpätie priemerných hodnôt 11,12-11,92 ‰. V hodnotách rebier nebol pozorovaný signifikantný rozdiel medzi rodinami, ale s priemernou hodnotou 10,45 ‰ sa opäť 1. rodina odlišuje od ostatných (11,38-12,39 ‰). Po vyradení vzoriek rebier 1. a 6. rodiny, bol v prípade $\delta^{15}\text{N}$ pozorovaný rozdiel na hranici signifikancie (p-hodnota = 0,057).

Rodina č. 1 sa v prípade analýzy na stehenných kostiach skladala z týchto jedincov: č. 39, 40, 41 a 43. Nízke hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sú zapríčinené hlavne vzorkou č. 39, ktorá má výrazne najnižšiu hodnotu $\delta^{15}\text{N}$ v celom súbore a tiež jedincom č. 43, ktorý má hneď druhú najnižšiu hodnotu $\delta^{15}\text{N}$ v súbore. Jedinec č. 43 umrel v pomerne mladom veku (20 rokov) a bol počas celého života závažne chorý. Ostatní jedinci vo vzorke mali tiež veľmi nízke hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ oproti ostatným jedincom v súbore, odchýlka teda nebola zapríčinená len dvomi jedincami s najnižšími hodnotami $\delta^{15}\text{N}$. Jedinec č. 40 bol tiež najdávnejšie zomretý jedinec z kompletnej vzorky jedincov. Na základe zdravotnej dokumentácie vieme, že príčina úmrtia bola u každého člena 1. rodiny odlišná. Rodina č. 6 bola zložená s jedincov č. 46, 47, 48 a 49, ktorí neboli s ostatnými jedincami v žiadnom príbuzenskom zväzku. Zdravotný stav 6. rodiny bol odlišný medzi jedincami, všetci sa však dožili pomerne vyššieho veku, vekové rozpätie úmrtí bolo 69-86 rokov.

Roľnícka rodina č. 1 sa odlišovala o niečo nižším sociálnym postavením než ostatné rodiny, ktoré boli zložené prevažne zo statkárov a vlastníkov malých podnikov (krčma), či regionálnych politikov. Sociálnym postavením (robotnícka rodina) sa odlišovala takisto 6. rodina, jej členovia boli viac na úrovni 1. rodiny než 2.-5. rodiny. Naše výsledky zodpovedajú sociálnemu statusu jednotlivých rodín a záverom predchádzajúcich prác, ktoré zaznamenali zvýšené hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ u jedincov s vyšším SES (van der Veen 2003; Vytlačil et al. 2018; Kaupová et al. 2018). Vysvetlením môže byť vyšší prísun živočišných bielkovín v strave 2.-5. rodiny oproti 1., prípadne 6. rodine (Ambrose & Norr 1993; DeNiro & Epstein 1978; 1981; Lee-Thorp 2008; Minagawa & Wada 1984; Schoeninger & DeNiro 1984), ale aj vyššia konzumácia strukovín rodiny č. 1 a 6, ktorá znižuje izotopové pomery $\delta^{15}\text{N}$ (Virginia & Delwiche 1982; Devincenzi et al. 2014). Ďalším faktorom môže byť častejší kontakt 2.-5. rodiny medzi sebou, 1. ani 6. rodina sa s ostatnými často nestýkala, a nebol tam tak výrazný

prekryv domácností než u zvyšných rodín, medzi ktorými sa vyskytovalo dokonca niekoľko príbuzenských manželstiev. Je nutné pripustiť aj vplyv náhody, nakoľko je početnosť v rodinách relatívne malá.

13.6 Vek dožitia

S vyšším vekom sa v tele hromadia procesy spojené so starnutím organizmu a patologické vplyvy, ktoré zhoršujú zdravotný stav organizmu. Zároveň sa postupne spomaľuje remodelácia kostného kolagénu, ktorá v 80. roku dosahuje rýchlosť 1,5-3 %/rok rok (Hedges et al. 2007; Fahy et al. 2017; Lamb et al. 2014; Cox & Sealy 1997). Vo vyššom veku sú častejšie i poruchy základných fyziologických procesov, ako je reparácia buniek a tkanív, rozpad bielkovín v tele prevažuje nad ich syntézou (Welle 2012), telo je prevažne v stave negatívnej dusíkovej bilancie, ktorá má za následok zvýšenie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ (Hobson et al., 1993; Katzenberg & Lovell, 1999; Reitsemá 2013; Mekota et al. 2006; Olsen et al. 2014; Schwarcz et al. 1999; White & Armelagos 1997). Všetky spomenuté faktory sa teoreticky môžu odzrkadliť na zmene izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne.

Korelačným testom sa nepreukázala žiadna závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v stehennej kosti ani rebre na konkrétnom veku dožitia jedincov v našom súbore. Ani po rozdelení súboru jedincov na vekové kategórie do 60 rokov a nad 60 rokov sa neprejavil signifikantný rozdiel v hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ ani v jednom type kosti. Priemerné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ boli v oboch kostiach veľmi málo zvýšené v kategórii jedincov s vyšším vekom (štatisticky nesignifikantný rozdiel v stehennej kosti 0,13 ‰ a v rebre 0,11 ‰). Hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ mali v stehennej kosti vyššie hodnoty o 0,16 ‰ u starších jedincov, ale v prípade rebra boli hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ vyššie v skupine jedincov do 60 rokov, pričom rozdiel bol len 0,06 ‰. Naše výsledky nezaznamenali signifikantný vplyv veku na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ ani v jednom type kosti.

Niektoré štúdie (Prowse et al. 2005; Vytlačil et al. 2018; Kaupová et al. 2018) uskutočnené na archeologických populáciách preukázali rozdiely v izotopových hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ v rôznych vekových kategóriách, ale rozdiely súviseli s odlišnou stravou jedincov v jednotlivých životných obdobiach (viď vyššie). Výskumy uskutočnené na viac recentných súboroch, napríklad štúdie Katzenberg (1993) a Lovell et al. (1986) kanadskej populácie z 19. storočia alebo Cox et al. (2001), ktorá sledovala vplyv veku na kostnom kolagéne africkej populácie z 18.-19. storočia, nepozorovali zmeny v izotopových hodnotách v závislosti na

veku. Výsledky diplomovej práce nesvedčia o tom, že by zmeny fyziologické zmeny spojené so starnutím organizmu ovplyvňovali izotopové hodnoty ako $\delta^{13}\text{C}$, tak $\delta^{15}\text{N}$.

Je dôležité podotknúť, že nami študovaný súbor jedincov tvorili prevažne jedinci vyššieho veku. Vo vzorkách stehenných kostí bolo jedincov s vekom vyšším než 60 rokov 32 (u rebier 23) a z nižším vekom len 13 (u rebier 9). Veľký počet jedincov v súbore taktiež trpel nejakým chronickým ochorením, ktoré môžu zvyšovať hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne bez ohľadu na vek jedinca (Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014).

13.7 Zdravotný stav

Analýzou ľudských mäkkých tkanív patologických vzoriek boli pozorované zmeny v izotopových pomeroch $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ (White & Armelagos 1997; Katzenberg & Lovell 1999; Fuller et al. 2005; Mekota et al. 2006).

Náš súbor jedincov bol rozdelený podľa dvoch rôznych kritérií. V prvom kroku testovania sme jedincov rozdelili do skupín podľa najčastejšej príčiny úmrtia na: TBC, srdcovo-cievne vady, mŕtvica, rakovina, opotrebovanie organizmu vekom a iné. Do poslednej skupiny boli zaradení jedinci buď s neznámou príčinou úmrtia, alebo s príčinou úmrtia spoločnou pre malý počet jedincov. Vo vzorke kostného materiálu stehenných kostí ani rebier sa nám nepodarilo preukázať signifikantnú závislosť medzi skupinami patológií a izotopovými hodnotami $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$. Výsledky mohli byť skreslené aj veľmi malým počtom jedincov v jednotlivých skupinách, napríklad skupinu srdcové vady rebier tvorili len 2 vzorky, čo na biologickú významnosť výsledku testu nestačí.

V niektorých skupinách boli pozorované výrazné odchýlky. Na krabicových grafoch (viď Graf 12.21 a 12.22) sú viditeľné odľahlé hodnoty vymykajúce sa z intervalu 1.-3. kvartilu. V prípade stehenných kostí sú to vzorky:

- č. 38 ($\delta^{13}\text{C} = -19,41 \text{ ‰}$) – jedinec ako jediný zo vzorky umrel na zápal srdcového svalu. Toto ochorenie môže mať iný metabolický priebeh než ostatné diagnózy zaradené do skupiny srdcovo-cievne vady.
- č. 39 ($\delta^{15}\text{N} = 8,96 \text{ ‰}$) – jedinec umrel na opotrebovanie organizmu vekom, je to ale jediná informácia ohľadom jeho zdravotného stavu, ktorú sme mali k dispozícii.
- č. 40 ($\delta^{15}\text{N} = 10,19 \text{ ‰}$) – ako jediný umrel na zápal obličiek, tzv. brigtickú chorobu. Bol zaradený do skupiny „iné“, ale je možné, že metabolický priebeh tohto ochorenia sa výrazne odlišuje od ostatných príčin úmrtia v rovnakej skupine.

- č. 46 ($\delta^{15}\text{N} = 10,27 \text{ ‰}$) – umrel na krvný opuch mozgu, jeho smrť bola náhla. Príčina úmrtia nemala efekt na izotopové hodnoty v kostnom kolagéne, preto je pozorovaná hodnota $\delta^{15}\text{N}$ zapríčinená skôr stravou.

Vo vzorke rebier sa v rámci skupiny „rakovina“ vymykajú dve vzorky, obe svojimi hodnotami uhlíka, pričom jedna je oproti ostatným výrazne zvýšená, druhá naopak znížená. Sú to:

- č. 22 ($\delta^{13}\text{C} = -18,80 \text{ ‰}$) – jedinec trpel karcinómom prostaty, veľmi metabolicky aktívnou formou nádoru, pričom v celom tele bolo nájdených mnoho metastáz, najviac bolo práve osteoplastických. Metastázy sa nachádzali aj na spracováwanej vzorke rebra, čo mohlo ovplyvniť výsledky izotopovej analýzy tkaniva.
- č. 34 ($\delta^{13}\text{C} = -20,35 \text{ ‰}$) – jedinec, ktorý trpel glaukómom a rakovinou pažeráku. Karcinóm v tráviacej sústave mohol ovplyvniť výživu jedinca, a tým i výsledné izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$.

Vzorka č. 22 je jedinec, ktorého kostný materiál bol najvýraznejšie postihnutý patologickými zmenami so značným množstvom metastáz po celom tele. Je nutné podotknúť, že kostná vzorka tohto jedinca sa vymykala svojimi hodnotami vo viacerých kategóriách. Okrem toho, že má najvyššiu hodnotu $\delta^{13}\text{C}$ v celom súbore, má jednu z najvyšších hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ a výrazne vyšší kolagénový výťažok než všetky ostatné vzorky v súbore – 40,72 %, pričom druhá najvyššia hodnota 27,00 % patrí jedincovi č. 5. Vysoký výťažok u jedinca č. 22 mohol byť spôsobený tiež chybou počas čistenia a spracovania vzorky, pretože poskytnutý kus rebra mal množstvo kostných metastáz a bol náročný na spracovanie.

V druhom kroku sme súbor jedincov rozdelili tak, že sme vytvorili kontrolnú skupinu jedincov, ktorí umreli náhle. Zaradili sme do nej všetkých jedincov, ktorých príčinou úmrtia bola mŕtvica, jedinca č. 5, ktorý zomrel násilnou smrťou a č. 6, ktorý umrel pri autonehode. Následne sme porovnali „kontrolu“ so skupinami chronických ochorení, ktoré zodpovedali predchádzajúcemu deleniu, a to TBC, srdcovo-cievne vady, rakovina a opotrebovanie organizmu vekom, pričom sme vyradili z testovania skupinu „iné“. Nepodarilo sa nám preukázať signifikantné rozdiely izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ medzi jedincami, ktorí umreli náhle a jedincami, ktorí dlho pred smrťou trpeli chronickým ochorením.

Pri zohľadnení ostatných ochorení, ktoré sa v súbore vyskytujú len u veľmi malého počtu jedincov, napríklad reumatoidná artritída, embólia či DM 2. typu sme došli k nasledujúcim záverom:

- jedinec č. 15 – príčinou úmrtia bol DM 2. typu, pričom izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ sa výrazne odlišujú medzi stehennou kosťou (11,55 ‰) a rebrom (12,30 ‰). Je možné, že rýchly priebeh ochorenia sa stihol prejaviť len v kostnom kolagéne rýchlejšie remodelujúcich rebier, zvýšením hodnôt $\delta^{15}\text{N}$.
- jedinci č. 14, 20 a 25 umreli na pľúcnu embóliu, avšak variabilitu v rámci týchto troch jedincov je vysoká, a zároveň sa nijak neodlišujú od ostatných jedincov.
- jedinec č. 17 – príčinou úmrtia bolo zlyhanie srdca, ale žena trpela minimálne 12 rokov pred smrťou reumatoidnou artritídou, ktorá by mohla súvisieť s vyššími hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$ v rebre oproti stehennej kosti.
- jedinec č. 19 – veľmi vážne chorý od detstva, dožil sa 45-tich rokov. Rok pred smrťou trpel osteomyelitídou. Izotopové hodnoty v rebre (12,26 ‰) boli výrazne vyššie než v stehennej kosti (11,79 ‰), čo môže mať príčinu práve v ochorení kostí. Pitevný protokol tohto jedinca preukázal, že trpel obezitou, vrstva podkožného tuku na bruchu bola v čase úmrtia 3 cm.

Vo väčšine prípadov mali jedinci vyššie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v rebrách oproti stehenným kostiam. To súhlasí s poznaním, že v rebrách sa kvôli rýchlejšej remodelácii kostného kolagénu (Lamb et al. 2014; Cox & Sealy 1997; Hedges et al. 2007; Fahy et al. 2017) stačilo odzrkadliť zhoršenie zdravotného stavu pred smrťou, ktoré má za následok zvýšenie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ (Mekota et al. 2006; Hatch et al. 2006; Neuberger et al. 2013; Katzenberg & Lovell 1999; Olsen et al. 2014; Salesse et al. 2019 in press).

Niektoré doterajšie výskumy na kostnom tkanive zaznamenali zmeny izotopov medzi patologickými vzorkami a zdravými kontrolami. Výrazné zvýšenie $\delta^{15}\text{N}$ (zvýšenie o 2 ‰) bolo pozorované u vzorky jedinca, ktorý trpel osteomyelitídou a ochorením AIDS (Katzenberg & Lovell 1999). Mierne zvýšenie bolo pozorované aj ako v hodnotách $\delta^{15}\text{N}$, tak i $\delta^{13}\text{C}$ u pacientov s osteomyelitídou (Olsen et al. 2014). Stav kachexie, ktorý býva často spájaný s rakovinou či srdcovými ochoreniami nebol doposiaľ pozorovaný ako príčina zmeny izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne (Welle 2012; Mancini et al. 1992) ani u jedincov v našom súbore. Práca Salesse et al. in press (2019) zaznamenala mierne nižšie hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ v kostnom kolagéne pacientov so syfilisom oproti zdravým kontrolám. Všetky výskumy vzorkovali

priamo patologické tkanivo, v tejto diplomovej práci bola jediná vzorka patologického segmentu tkaniva, a to č. 22. Interpretácia našich výsledkov môže byť ovplyvnená malým počtom vzoriek v jednotlivých skupinách, avšak medzi jednotlivými patologickými skupinami ani medzi jedincami kontrolnej skupiny a skupinami s chronickými ochoreniami sa nám nepodarilo preukázať ani mierny vplyv na izotopové hodnoty. Rýchlosť kostného kolagénu môže byť príliš pomalá na zmenu organizmu zologickej príčiny, ktorá je často postupná.

13.8 Počet pôrodov a počet rokov od posledného pôrodu

Okrem vplyvu zdravotného stavu na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ sme sa zamerali aj na vplyv počtu pôrodov a počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím u žien. Počas tehotenstva je telo ženy v anabolickom stave, a teda stave pozitívnej dusíkovej bilancie, ktorá znižuje izotopové hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v keratizovanom, ale i kostnom tkanive. Izotopové zmeny $\delta^{13}\text{C}$ preukázané neboli (Nitsch et al. 2010; Fuller et al. 2004; D'Ortenzio et al. 2015).

Predpoklad bol, že viacnásobné rodičky, a teda ženy, ktoré boli nezanedbateľnú časť svojho života v stave pozitívnej dusíkovej bilancie, by mali vykazovať nižšie hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom kolagéne (predovšetkým v stehenných kostiach) než ženy s menším počtom pôrodov a ženy, ktoré nerodili vôbec. Pozorovali sme, či vyšší počet pôrodov môže ovplyvniť izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$. Pri sledovaní počtu pôrodov bol interval izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí žien -20,31--19,34 ‰ a rebier -20,35--19,10 ‰, interval hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí bol 10,19-12,45 ‰ a rebier 11,23-12,57 ‰. Izotopovou analýzou kostného kolagénu v stehenných kostiach a rebrách žien a následným testovaním závislosti, sa predpoklad nepodarilo potvrdiť.

Ďalej sme predpokladali, že tehotenstvo sa môže zaznamenať v kostnom kolagéne ženy, v tomto prípade hlavne v rebrách, ktoré by kvôli svojej rýchlej remodelácii mohli zaznamenať v izotopovom profile aj relatívne krátku zmenu, akou je tehotenstvo (Nitsch et al. 2010). Kostný kolagén v rebre dospelého človeka obmieňa približne každých 5-10 rokov (Hedges et al. 2007; Fahy et al. 2017; Lamb et al. 2014). Ženy v sledovanom súbore mali však interval medzi posledným pôrodom a úmrtím príliš vysoký, 9-60 rokov. Je teda veľmi pravdepodobné, že kolagén v rebre sa stihol za toto obdobie obmeniť z veľkej väčšiny až úplne a už nenesie izotopový záznam z tehotenstva. Pri skúmaní počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím ženy bol interval izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí žien -20,31--19,41 ‰ a rebier -20,35--19,40 ‰, interval hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ stehenných kostí bol 10,19-12,45 ‰ a rebier 11,23-12,57 ‰.

‰. Testovaním sa nám nepodarilo potvrdiť závislosť vplyvu počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím na izotopové pomery $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$.

Pri pozorovaní hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$ žien, ktoré zostali počas života bezdetné (č. 12, 16 a 24) nebol zaznamenaný výkyv v hodnotách $\delta^{13}\text{C}$ vzoriek č. 12 a 16, ale vzorka č. 24 mala jedny z najvyšších hodnôt uhlíka v oboch analyzovaných kostiach. Hodnotami $\delta^{15}\text{N}$ sa bezdetné ženy nijak neodlišovali od žien, ktoré počas života rodili, avšak vzorka č. 24 mala opäť mierne zvýšené hodnoty dusíka. V tomto prípade môžeme hľadať príčinu skôr v zlom zdravotnom stave tejto ženy (viď vyššie).

Nepodarilo sa nám preukázať signifikantnú závislosť izotopových hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ na počte pôrodov alebo počte rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím ženy, a to ani v jednom type analyzovanej kosti. Je nutné zohľadniť veľkosť našej vzorky pri tomto testovaní, ktorá nebola početná, a v prípade sledovania počtu rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím ženy, aj privysoké rozpätie rokov. V práci Nitsch et al. (2010) bol preukázaný malý vplyv pôrodov na izotopové hodnoty v kostnom kolagéne rebier žien. Závislosť bola pozorovaná iba v prípade, že žena rodila niekoľkokrát počas života, a zároveň umrela do piatich rokov od posledného pôrodu. Vtedy boli hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ v kostnom zázname znížené. Vplyv tehotenstva bol v kolagéne zapísaný a v čase smrti bolo možné túto izotopovú zmenu stále zaznamenať, pretože kostné tkanivo rebra sa ešte nestačilo obmeniť. Ak bolo rozpätie rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím viac než 5 rokov alebo ženy rodili počas života len raz, nebolo možné zmenu izotopových hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ zaznamenať (Nitsch et al. 2010). Tomu zodpovedajú aj výsledky našej analýzy. Práce Fuller et al. (2004) a D’Ortenzio et al. (2015) pozorovali zníženie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ vo vlasových vzorkách žien, je teda možné, že krátka zmena v izotopovom zázname sa neprejaví aj sa pomaly sa remodelujúcom kostnom tkanive.

14 Záver

Predložená diplomová práca skúmala pomocou analýzy stabilných izotopov uhlíka a dusíka v kostnom kolagéne vplyv rôznych faktorov na izotopový profil jedinca. Sledovaný bol vzťah dvoch typov kostí s rôznou rýchlosťou obmeny kolagénu, vplyv biologických faktorov ako pohlavie a vek dožitia, závislosť na dátume úmrtia jedinca, a tiež fyziologických a patofyzilogických faktorov, ako počet pôrodov u ženy a zdravotný stav jedincov. Na základe uskutočnených testovaní a výsledkov tejto práce sú vynesené nasledujúce závery:

- Vplyv veku jedinca na izotopové hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ ani $\delta^{15}\text{N}$ preukázaný nebol. Kumulácia patologických vplyvov vo vyššom veku jedinca nepreukázala vplyv na izotopové hodnoty.
- Zmena environmentálnych podmienok počas obdobia vymedzeného úmrtím jedincov preukázala malý vplyv na izotopové hodnoty dusíka.
- Mierne odlišnosti v sociálnom statuse rodín mali pozorovateľný vplyv na izotopové hodnoty. Rozdiely sú skôr spojené s kvalitnejšou stravou ako kvalitnejšou zdravotnou starostlivosťou u jedincov s vyšším sociálnym postavením.
- Jedinci, ktorí trpeli chronickým ochorením sa v izotopových hodnotách nijak neodlišovali od jedincov, ktorí umreli náhle.
- Tehotenstvo je príliš krátka zmena organizmu, aby sa stihla prejaviť v pomaly sa obmieňajúcom kostnom tkanive. Počet pôrodov ženy ani počet rokov medzi posledným pôrodom a úmrtím nemá vplyv na izotopové hodnoty.

Rozdiely v izotopových hodnotách uhlíka i dusíka sú pravdepodobne zapríčinené vplyvom odlišnej stravy na úrovni rodín a jednotlivcov. Zdravotný stav nemá preukázateľný vplyv na izotopové hodnoty v kostnom kolagéne. Analýza stabilných izotopov uhlíka a dusíka sa javí ako vhodná metóda pre štúdium stravy minulých populácií.

15 Zoznam použitých literatúr

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science, p. 760. ISBN 0-8153-3218.
- Ambrose, S. H., & DeNiro, M. J. (1986). Reconstruction of African human diet using bone collagen carbon and nitrogen isotope ratios. *Nature*, 319(6051), 321.
- Ambrose, S. H. (1990). Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*, 17(4), 431-451.
- Ambrose, S. H., Norr L. (1993). Given the isotopic composition of a specific tissue, that of the diet or of other tissues may be calculated if the. In: Lambert JB, Grupe G, editors. Prehistoric human bone. Berlin, Heidelberg: Springer. p 1–37.
- Ambrose, S. H., Butler, B. M., Hanson, D. B., HunterAnderson, R. L., & Krueger, H. W. (1997). Stable isotopic analysis of human diet in the Marianas archipelago, Western Pacific. *American Journal of Physical Anthropology*, 104(3), 343-361.
- Ambrose, S. H. (2000). Controlled diet and climate experiments on nitrogen isotope ratios of rats. Biogeochemical Approaches to Paleodietary Analysis.
- Baracos, V. E., Whitmore, W. T., & Gale, R. (1987). The metabolic cost of fever. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 65(6), 1248-1254.
- Barrett, J., Johnstone, C., Harland, J., Van Neer, W., Ervynck, A., Makowiecki, D., Heinrich, D., Hufthammer, A. K., Enghoff, I. B., Amundsen, C., Christiansen, J. S., Jones, A. K. G., Locker, A., Hamilton-Dyer, A., Jonsson, L., Lõugas, L., Roberts, C., & Richards, M. (2008). Detecting the medieval cod trade: a new method and first results. *Journal of Archaeological Science*, 35(4), 850-861.
- Bateman, A. S., & Kelly, S. D. (2007). Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in environmental and health studies*, 43(3), 237-247.
- Beaumont, J., Geber, J., Powers, N., Wilson, A., Lee-Thorp, J., & Montgomery, J. (2013). Victims and survivors: stable isotopes used to identify migrants from the Great Irish Famine to 19th century London. *American Journal of Physical Anthropology*, 150(1), 87-98.
- Bell, L. S., Cox, G., & Sealy, J. (2001). Determining isotopic life history trajectories using bone density fractionation and stable isotope measurements: a new approach. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 116(1), 66-79.
- Bičík, I., Kupková, L., Jeleček, L., Kabrda, J., Štych, P., Janoušek, Z., & Winklerová, J. (2015).

- Land Use Changes in Czechia 1845–2010. In *Land Use Changes in the Czech Republic 1845–2010* (pp. 95-170). Springer, Cham.
- Bogaard A., Heaton T. H., Poulton P. & Merbach I. (2007) The impact of manuring on nitrogen isotope ratios in cereals: archaeological implications for reconstruction of diet and crop management practices. *Journal of Archaeological Science* 34 (3): 335-343.
- Chenery, C. A., Pashley, V., Lamb, A. L., Sloane, H. J., & Evans, J. A. (2012). The oxygen isotope relationship between the phosphate and structural carbonate fractions of human bioapatite. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(3), 309-319.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., & Turner-Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry*, 44, 383-394.
- Corr, L. T., Sealy, J. C., Horton, M. C., & Evershed, R. P. (2005). A novel marine dietary indicator utilising compound-specific bone collagen amino acid $\delta^{13}\text{C}$ values of ancient humans. *Journal of Archaeological Science*, 32(3), 321-330.
- Cox, G., Sealy, J., (1997). Investigating identity and life history: isotopic analysis and historical documentation of slave skeletons found in the Cape Town foreshore, South Africa. *Int. J. Hist. Archaeol.* 1, 207-224.
- Cox, G., Sealy, J., Schrire, C., & Morris, A. (2001). Stable carbon and nitrogen isotopic analyses of the underclass at the colonial Cape of Good Hope in the eighteenth and nineteenth centuries. *World Archaeology*, 33(1), 73-97.
- Cvrček, J., Velemínský, P., Dupej, J., Vostrý, L., & Brůžek, J. (2018). Kinship and morphological similarity in the skeletal remains of individuals with known genealogical data (Bohemia, 19th to 20th centuries): A new methodological approach. *American journal of physical anthropology*, 167(3), 541-556.
- Češka, R. (2010) . *Interna*. 1. vydání. Praha : Triton, 855 s. ISBN 978-80-7387-423-0.
- D'Ortenzio L. D., Brickley M., Schwarcz H., Prowse T. (2015). You Are Not What You Eat During Physiological Stress : Isotopic Evaluation of Human Hair. 00.
- Deniro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 42(5), 495-506.
- Deniro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 45(3), 341-351.
- Denne, S. C., Brechtel, G., Johnson, A., Liechty, E. A., & Baron, A. D. (1995). Skeletal muscle proteolysis is reduced in noninsulin-dependent diabetes mellitus and is unaltered by euglycemic hyperinsulinemia or intensive insulin therapy. *The Journal of Clinical*

- Endocrinology & Metabolism*, 80(8), 2371-2377.
- Devincenzi, T., Delfosse, O., Andueza, D., Nabinger, C., & Prache, S. (2014). Dose-dependent response of nitrogen stable isotope ratio to proportion of legumes in diet to authenticate lamb meat produced from legume-rich diets. *Food chemistry*, 152, 456-461.
- Doucette, J. L., Wissel, B., & Somers, C. M. (2010). Effects of Lipid Extraction and Lipid Normalization on Stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios in Double-crested Cormorants: Implications for Food Web Studies. *Waterbirds*, 33(3), 273-284.
- Dreslerová, G., & Hajnalová, M. (2013). Subsistenční strategie raně středověkých populací v dolním Podýjí Archeozoologické a archeobotanické vyhodnocení nálezů z výzkumu Kostice-Zadní hrád (2009-2011). *Archeologické rozhledy*, 65(4).
- Eastoe, J. E. (1955). The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 61(4), 589.
- Fahy, G. E., Deter, C. A., Pitfield, R., & Mahoney, P. (2017). Bone deep: stable nitrogen isotope ratios and histomorphometric measurements of bone remodelling within adult human skeletons. *American Journal of Physical Anthropology*, 162, 175-176.
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., & Hubick, K. T. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 503-537.
- Fernandes, R., Grootes, P., Nadeau, M. J., & Nehlich, O. (2015). Quantitative diet reconstruction of a Neolithic population using a Bayesian mixing model (FRUITS): The case study of Ostorf (Germany). *American Journal of Physical Anthropology*, 158(2), 325-340.
- Fernandes, R., Nadeau, M. J., & Grootes, P. M. (2012). Macronutrient-based model for dietary carbon routing in bone collagen and bioapatite. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 4(4), 291-301.
- Ferrio, J. P., Araus, J. L., Buxó, R., Voltas, J., & Bort, J. (2005). Water management practices and climate in ancient agriculture: inferences from the stable isotope composition of archaeobotanical remains. *Vegetation History and Archaeobotany*, 14(4), 510-517.
- Fogel, R. W. (1989). Second thoughts on the European escape from hunger: famines, price elasticities, entitlements, chronic malnutrition, and mortality rates.
- Fogel, R. W. (1997). New findings on secular trends in nutrition and mortality: some implications for population theory. *Handbook of population and family economics*, 1, 433-481.
- Francey, R. J., Allison, C. E., Etheridge, D. M., Trudinger, C. M., Enting, I. G., Leuenberger,

- M., Langenfelds, R. L., Michel, E., & Steele, L. P. (1999). A 1000-year high precision record of $\delta^{13}\text{C}$ in atmospheric CO_2 . *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology*, 51(2), 170-193.
- Fraser, R., Bogaard, A., Heaton, T., Charles, M., Jones, G., Christensen, B. T., Halstead, P., Merbach, I., Poulton, P. R., Sparkes, D., & Styring, A. (2011) Manuring and stable nitrogen isotope ratios in cereals and pulses: towards a new archaeobotanical approach to the inference of land use and dietary practices. *Journal of Archaeological Science* 38: 2790-2804.
- Fuller, B. T., Fuller, J. L., Sage, N. E., Harris, D. A., O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. (2004). Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(23), 2889-2896.
- Fuller, B. T., Fuller, J. L., Sage, N. E., Harris, D. A., O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. (2005). Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 19(18), 2497-2506.
- Fuller, B. T., Muldner, G., Van Neer, W., Ervynck, A., & Richards, M. P. (2012). Carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis of freshwater, brackish and marine fish from Belgian archaeological sites (1st and 2nd millennium AD). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(5), 807-820.
- Gannes, L. Z., O'Brien, D. M., & Del Rio, C. M. (1997). Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, 78(4), 1271-1276.
- Gelfand, R. A., Matthews, D. E., Bier, D. M., & Sherwin, R. S. (1984). Role of counterregulatory hormones in the catabolic response to stress. *The Journal of clinical investigation*, 74(6), 2238-2248.
- Gelse, K., Poschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531-1546.
- Gibson, J. N. A., Poyser, N. L., Morrison, W. L., Scrimgeour, C. M., & Rennie, M. J. (1991). Muscle protein synthesis in patients with rheumatoid arthritis: effect of chronic corticosteroid therapy on prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ availability. *European journal of clinical investigation*, 21(4), 406-412.
- Gougeon, R., Pencharz, P. B., & Sigal, R. J. (1997). Effect of glycemic control on the kinetics of whole-body protein metabolism in obese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus during iso-and hypoenergetic feeding. *The American journal of*

- clinical nutrition*, 65(3), 861-870.
- Gröcke, D. R., Bocherens, H., & Mariotti, A. (1997). Annual rainfall and nitrogen-isotope correlation in macropod collagen: application as a palaeoprecipitation indicator. *Earth and Planetary Science Letters*, 153(3-4), 279-285.
- Halffman, C. M., & Velemínský, P. (2015). Stable isotope evidence for diet in early medieval Great Moravia (Czech Republic). *Journal of Archaeological Science: Reports*, 2, 1-8.
- Hatch, K. A., Crawford, M. A., Kunz, A. W., Thomsen, S. R., Eggett, D. L., Nelson, S. T., & Roeder, B. L. (2006). An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using N-15/N-14 and C-13/C-12 ratios in hair. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(22), 3367-3373. doi:10.1002/rcm.2740.
- Hatch, K. A. (2012). The use and application of stable isotope analysis to the study of starvation, fasting, and nutritional stress in animals. In *Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation* (pp. 337-364). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Heaton, T. H. (1987). The 15 N/14 N ratios of plants in South Africa and Namibia: relationship to climate and coastal/saline environments. *Oecologia*, 74, 236-246.
- Hedges, R. E. M., Clement, J. G., Thomas, C. D. L., & O'Connell, T. C. (2007). Collagen turnover in the adult femoral mid-shaft: Modeled from anthropogenic radiocarbon tracer measurements. *American Journal of Physical Anthropology*, 133(2), 808-816.
- Hobson, K. A., & Clark, R. G. (1992). Assessing avian diets using stable isotopes I: turnover of 13C in tissues. *The Condor*, 94(1), 181-188.
- Hobson K. A., Alisauskas R. T., Clark R. G. (1993). Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: Implications for isotopic analyses of diet. *The Condor* 95:388–394.
- Hockett, B., & Haws, J. (2003). Nutritional ecology and diachronic trends in paleolithic diet and health. *Evolutionary Anthropology*, 12(5), 211-216.
- Hoefs J. (2009). *Stable Isotope Geochemistry*. 6th ed. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Honch, N. V., McCullagh, J. S., & Hedges, R. E. (2012). Variation of bone collagen amino acid $\delta^{13}\text{C}$ values in archaeological humans and fauna with different dietary regimes: Developing frameworks of dietary discrimination. *American journal of physical anthropology*, 148(4), 495-511.
- Howland, M. R., Corr, L. T., Young, S. M., Jones, V., Jim, S., Van Der Merwe, N. J., Mitchell, A. D., & Evershed, R. P. (2003). Expression of the dietary isotope signal in the compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ values of pig bone lipids and amino acids. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1-2), 54-65.

- Jim, S., Ambrose, S. H., & Evershed, R. P. (2004). Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: Implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 68(1), 61-72.
- Jim, S., Jones, V., Ambrose, S. H., & Evershed, R. P. (2006). Quantifying dietary macronutrient sources of carbon for bone collagen biosynthesis using natural abundance stable carbon isotope analysis. *British Journal of Nutrition*, 95(6), 1055-1062.
- Jindra, Z., & Jakubec, I. (2015). *Hospodářský vzestup českých zemí od poloviny 18. století do konce monarchie*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Jørkov, M. L. S., & Gröcke, D. R. (2017). Investigating adult diet during Industrialization in Copenhagen based on stable isotope analysis of bone collagen and hair keratin. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9(7), 1327-1341.
- Katzenberg, M. A. (1993). Age differences and population variation in stable isotope values from Ontario, Canada. In *Prehistoric Human Bone* (pp. 39-62). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Katzenberg, M. A., Herring, D. A., & Saunders, S. R. (1996). Weaning and infant mortality: evaluating the skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 101(S23), 177-199.
- Katzenberg, M. A., & Lovell, N. C. (1999). Stable isotope variation in pathological bone 1. *International Journal of Osteoarchaeology*, 9(5), 316-324.
- Katzenberg, M. A., & Pfeiffer, S. (1995). JL4 nitrogen isotope evidence for weaning age in a nineteenth century canadian skeletal sample. *Bodies of evidence: reconstructing history through skeletal analysis*, 221.
- Kaupová, S., Velemínský, P., Herrscher, E., Sládek, V., Macháček, J., Poláček, L., & Brůžek, J. (2018). Diet in transitory society: isotopic analysis of medieval population of Central Europe (ninth–eleventh century AD, Czech Republic). *Archaeological and Anthropological Sciences*, 10(4), 923-942.
- Keeley, J. E., & Sandquist, D. R. (1992). Carbon – fresh-water plants. *Plant Cell and Environment*, 15(9), 1021-1035.
- Kellner, C. M., Schoeninger, M. J. (2007). A simple carbon isotope model for reconstructing prehistoric human diet. *Am J Phys Anthropol* 133:1112–1127.
- Kiljunen, M., Grey, J., Sinisalo, T., Harrod, C., Immonen, H., & Jones, R. I. (2006). A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for

- isotope mixing models. *Journal of Applied Ecology*, 43(6), 1213-1222.
- Klepinger, L. L. (1984). Nutritional assessment from bone. *Annual Review of Anthropology*, 13, 75-96.
- Knipper, C., Peters, D., Meyer, C., Maurer, A. F., Muhl, A., Schöne, B. R., & Alt, K. W. (2013). Dietary reconstruction in Migration Period Central Germany: a carbon and nitrogen isotope study. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 5(1), 17-35.
- Krueger, H. W., & Sullivan, C. H. (1984). Models for carbon isotope fractionation between diet and bone. *Stable isotopes in nutrition*, 258, 205-220.
- Lamb, A. L., Evans, J. E., Buckley, R., & Appleby, J. (2014). Multi-isotope analysis demonstrates significant lifestyle changes in King Richard III. *Journal of Archaeological Science*, 50, 559-565.
- Lee, J. M., Boyle, E. A., Echegoyen-Sanz, Y., Fitzsimmons, J. N., Zhang, R., & Kayser, R. A. (2011). Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in seawater using single batch nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 686(1-2), 93-101.
- Lee-Thorp, J. A. (2008). On isotopes and old bones. *Archaeometry*, 50, 925-950.
- Longin, R. (1971). New method of collagen extraction for radiocarbon dating. *Nature* 230:241–242.
- Lovell, N. C., Nelson, D. E., & Schwarcz, H. P. (1986). Carbon isotope ratios in palaeodiet: lack of age or sex effect. *Archaeometry*, 28(1), 51-55.
- Macko, S. A., Engel, M. H., Andrusevich, V., Lubec, G., O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. M. (1999). Documenting the diet in ancient human populations through stable isotope analysis of hair. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 354(1379), 65-75.
- Macko, S. A., Lee, W. Y., & Parker, P. L. (1982). Nitrogen and carbon isotope fractionation by 2 species of marine amphipods – laboratory and fields studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 63(2), 145-149.
- Mancini, D. M., Walter, G., Reichel, N., Lenkinski, R., McCully, K. K., Mullen, J. L., & Wilson, J. R. (1992). Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation*, 85(4), 1364-1373.
- Marino, B. D., & McElroy, M. B. (1991). Isotopic composition of atmospheric CO₂ inferred from carbon in C₄ plant cellulose. *Nature*, 349(6305), 127.
- Mays, S., & Beavan, N. (2012). An investigation of diet in early Anglo-Saxon England using carbon and nitrogen stable isotope analysis of human bone collagen. *Journal of*

- Archaeological Science*, 39(4), 867-874.
- Medeiros, L., Monteiro, D. D., Petit, R., & Bugoni, L. (2015). Effects of lipid extraction on the isotopic values of sea turtle bone collagen. *Aquatic Biology*, 23(3), 191-199.
- Mekota, A. M., Grupe, G., Ufer, S., & Cuntz, U. (2006). Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(10), 1604-1610.
- Minagawa, M. (1992). Reconstruction of human diet from $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in contemporary Japanese hair – a stochastic method for estimating multisource contribution by double isotopic tracers. *Applied Geochemistry*, 7(2), 145-158.
- Minagawa, M., & Wada, E. (1984). Stepwise enrichment of ^{15}N along food-chains – further evidence and relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 48(5), 1135-1140.
- Mintenbeck, K., Brey, T., Jacob, U., Knust, R., & Struck, U. (2008). How to account for the lipid effect on carbon stable-isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$): sample treatment effects and model bias. *Journal of Fish Biology*, 72(4), 815-830.
- Morrison, W. L., Gibson, J. N. A., & Rennie, M. J. (1988). Skeletal muscle and whole body protein turnover in cardiac cachexia: influence of branched-chain amino acid administration. *European journal of clinical investigation*, 18(6), 648-654.
- Müldner, G., & Richards, M. P. (2007). Stable isotope evidence for 1500 years of human diet at the city of York, UK. *American Journal of Physical Anthropology*, 133(1), 682-697.
- Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., & Wasserman, W. (1996). *Applied linear statistical models* (Vol. 4, p. 318). Chicago: Irwin.
- Neuberger, F. M., Jopp, E., Graw, M., Püschel, K., & Grupe, G. (2013). Signs of malnutrition and starvation—Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic Science International*, 226(1-3), 22-32.
- Nielsen-Marsh, C. M., Hedges, R. E. M. (2000). Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. :1139–1150.
- Nitsch, E. K., Humphrey L. T. & Hedges R. E. M. (2010) The effect of parity status on $\delta^{15}\text{N}$: looking for the “pregnancy effect” in 18th and 19th century London. *Journal of Archaeological Science* 37 (12): 3191-3199.
- O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. M. (1999). Investigations into the effect of diet on modern human hair isotopic values. *American Journal of Physical Anthropology*, 108(4), 409-425.

- O'Connell, T. C., Hedges, R. E. M., Healey, M. A., & Simpson, A. H. R. (2001). Isotopic comparison of hair, nail and bone: Modern analyses. *Journal of Archaeological Science*, 28(11), 1247-1255.
- O'Connell, T. C., Kneale, C. J., Tasevska, N., & Kuhnle, G. G. C. (2012). The diet-body offset in human nitrogen isotopic values: A controlled dietary study. *American Journal of Physical Anthropology*, 149(3), 426-434.
- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20:553–567.
- Olsen, K. C., White, C. D., Longstaffe, F. J., von Heyking, K., McGlynn, G., Grupe, G., & Rühli, F. J. (2014). Intraskletal isotopic compositions ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) of bone collagen: Nonpathological and pathological variation. *American Journal of Physical Anthropology*, 153(4), 598-604.
- Ortner, D. J. (2003). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. San Diego: Academic Press.
- Osmond, C. B., Valaane, N., Haslam, S. M., Uotila, P., & Roksandic, Z. (1981). Comparisons of $\delta^{13}\text{C}$ values in leaves of aquatic macrophytes from different habitats in Britain and Finland – some implications for photosynthetic processes in aquatic plants. *Oecologia*, 50(1), 117-124.
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 293-320. doi:10.1146/annurev.ecolsys.18.1.293.
- Pollard, A. M., Ditchfield, P., Piva, E., Wallis, S., Falys, C., & Ford, S. (2012). 'Sprouting like cockle amongst the wheat': the St Brice's Day massacre and the isotopic analysis of human bones from St John's College, Oxford. *Oxford Journal of Archaeology*, 31(1), 83-102.
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703-718.
- Povýšil, C., & Šteiner, I. (2007). *Speciální patologie*. 2. vydání. Praha : Galén, Karolinum, ISBN 978-80-7262-494-2 (Galén), 80-246-1442-7 (Karolinum).
- Privat, K. L., O'Connell, T. C., & Richards, M. P. (2002). Stable isotope analysis of human and faunal remains from the Anglo-Saxon cemetery at Berinsfield, Oxfordshire: Dietary and social implications. *Journal of Archaeological Science*, 29(7), 779-790.
- Prowse, T. L., Schwarcz, H. P., Saunders, S. R., Macchiarelli, R., & Bondioli, L. (2005). Isotopic evidence for age-related variation in diet from Isola Sacra, Italy. *American Journal of Physical Anthropology*, 128(1), 2-13.
- Reeds P. J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J Nutr* 130:1835S–

1840S.

- Reitsema, L. J. (2013). Beyond diet reconstruction: Stable isotope applications to human physiology, health, and nutrition. *American Journal of Human Biology*, 25(4), 445-456.
- Reitsema, L. J., & Vercellotti, G. (2012). Stable isotope evidence for sex- and status-based variations in diet and life history at medieval Trino Vercellese, Italy. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(4), 589-600.
- Roth, J. D., & Hobson, K. A. (2000). Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of zoology*, 78(5), 848-852.
- Roth, J. D., Hobson, K. A. (2011). Stable Carbon and Nitrogen Isotopic Fractionation Between Diet and Tissue of Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox : implications for dietary reconstruction.
- Roubenoff, R., Roubenoff, R. A., Cannon, J. G., Kehayias, J. J., Zhuang, H., Dawson-Hughes, B., & Rosenberg, I. H. (1994). Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 93(6), 2379-2386.
- Salesse, K., Dufour, É., Castex, D., Velemínský, P., Santos, F., Kuchařová, H., Jun, L., & Brůžek, J. (2013). Life history of the individuals buried in the St. Benedict Cemetery (Prague, 15th–18th Centuries): Insights from 14C dating and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$) analysis. *American Journal of Physical Anthropology*, 151(2), 202-214.
- Salesse, K., Kaupová, S., Bruzek, J., Kuželka, V., & Veleminsky, P. (in press). (2019). An Isotopic Case Study of Individuals with Syphilis from the PathologicalAnatomical Reference Collection of the National Museum in Prague (Czech Republic, 19th century A.D.).
- Schoeller, D. A. (1999). Isotope fractionation: Why aren't we what we eat? *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 667-673.
- Schoeninger, M. J., & Deniro, M. J. (1984). Nitrogen and carbon isotopic composition of bone-collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 48(4), 625-639.
- Schoeninger, M. J., Deniro, M. J., & Tauber, H. (1983). Stable nitrogen isotope ratios of bone-collagen reflect marine and terrestrial components of prehistoric human diet. *Science*, 220(4604), 1381-1383.
- Schoeninger, M. J., Nelson, B. K., & Deniro, M. J. (1984). Bone strontium levels in modern animals and strontium isotopic evidence for diagenetic alteration of bone –

- consequences for diet reconstruction. *American Journal of Physical Anthropology*, 63(2), 216-216.
- Schoeninger, M. J. (2010). Diet reconstruction and ecology using stable isotope ratios. *A companion to biological anthropology*, 445-464.
- Schwarcz, H. P., & Schoeninger, M. J. (1991). Stable isotope analyses in human nutritional ecology. *Yearbook of Physical Anthropology*, 34, 283-321.
- Schwarcz, H. P., Dupras, T. L., Fairgrieve, S. I. (1999). ^{15}N Enrichment in the Sahara: In Search of a Global Relationship. *J Archaeol Sci* 26:629–636.
- Schwarcz, H. P. (2000). Some biochemical aspects of carbon isotopic paleodiet studies. In: Ambrose, S. H., Katzenberg, M. A., edit. *Biogeochemical approaches to paleodietary analysis*. Kluwer Academic Publishers. str. 189–209.
- Schulting, R. J. (1998). Slighting the sea : stable isotope evidence for the transition to farming in northwestern Europe. *Doc Praehist* 25:203–218.
- Schutkowski, H., Herrmann, B., Wiedemann, F., Bocherens, H., & Grupe, G. (1999). Diet, status and decomposition at Weingarten: trace element and isotope analyses on early mediaeval skeletal material. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 675-685.
- Sealy, J. C., Van der Merwe, N. J., Hobson, K. A., Horton, D. R., Lewis, R. B., Parkington, J., Robertshaw, P., & Schwarcz, H. P. (1986). Isotope assessment and the seasonal-mobility hypothesis in the Southwestern Cape of South Africa [and comments and replies]. *Current Anthropology*, 27(2), 135-150.
- Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K., & Hollinger, J. O. (2005). Fracture repair. In *Bone regeneration and repair* (pp. 21-44). Humana Press.
- Smith, B. N., & Epstein, S. (1971). 2 categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. *Plant Physiology*, 47(3), 380-&.
- Steele, K. W., & Daniel, R. M. (1978). Fractionation of nitrogen isotopes by animals – a further complication to use of variations in natural abundance of ^{15}N for tracer studies. *Journal of Agricultural Science*, 90(FEB), 7-9.
- Stloukal, M., & Dobisíková, M. (1999). *Antropologie: příručka pro studium kostry*. Národní muzeum.
- Sweeting, C. J., Barry, J., Barnes, C., Polunin, N. V. C., & Jennings, S. (2007). Effects of body size and environment on diet-tissue delta N-15 fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(1), 1-10.
- Tafuri, M. A., Craig, O. E., & Canci, A. (2009). Stable Isotope Evidence for the Consumption of Millet and Other Plants in Bronze Age Italy. *American Journal of Physical*

- Anthropology*, 139(2), 146-153.
- Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animals-tissues – implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*, 57(1-2), 32-37.
- Tieszen, L. L., & Boutton, T. W. (1989). Stable carbon isotopes in terrestrial ecosystem research. In *Stable isotopes in ecological research* (pp. 167-195). Springer, New York, NY.
- van der Rest, M., & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB journal*, 5(13), 2814-2823.
- van Klinken, G. J. (1999). Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 687-695.
- van Klinken G. J., Richards M. P. & Hedges B. E. (2002) An overview of causes for stable isotopic variations in past European human populations: environmental, ecophysiological, and cultural effects. In: Ambrose S. H. & Katzenberg M. A. (eds.) *Biogeochemical Approaches to Paleodietary Analysis*. Springer: New York, pp. 39-63.
- van der Merwe, N. J., & Vogel, J. C. (1978). ^{13}C content of human collagen as a measure of prehistoric diet in woodland North-America. *Nature*, 276(5690), 815-816.
- Van der Merwe, N. J. (1982). Carbon isotopes, photosynthesis, and archaeology: Different pathways of photosynthesis cause characteristic changes in carbon isotope ratios that make possible the study of prehistoric human diets. *American Scientist*, 70(6), 596-606.
- Van der Veen, M. (2003). When is food a luxury?. *World Archaeology*, 34(3), 405-427.
- Virginia, R. A., & Delwiche, C. C. (1982). Natural ^{15}N abundance of presumed N_2 -fixing and non- N_2 -fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*, 54(3), 317-325.
- Voet, D., & Voet, J. G. (1990). *Biochemistry*. New York, Chichester, Brisbane.
- Vogel, J. C., & van der Merwe, N. J. (1977). Isotopic evidence for early maize cultivation in New York State. *American Antiquity*, 42(2), 238-242.
- Vytlačil, Z., Kaupová, S., Lefebvre, A., Velemínský, P., & Brůžek, J. (2018). A time of change: dietary reconstruction of the Merovingian cemetery of Norroy-le-Veneur, France. *Anthropologischer Anzeiger; Bericht uber die biologisch-anthropologische Literatur*, 75(4), 325-338.
- Wada, E., Kadonaga, T., & Matsuo, S. (1975). ^{15}N abundance in nitrogen of naturally occurring substances and global assessment of denitrification from isotopic viewpoint. *Geochemical Journal*, 9(3), 139-148.
- Waters-Rist, A. L., & Katzenberg, M. A. (2010). The effect of growth on stable nitrogen isotope

- ratios in subadult bone collagen. *International Journal of Osteoarchaeology*, 20(2), 172-191.
- Webb, E. C., Stewart, A., Miller, B., Tarlton, J., & Evershed, R. P. (2016). Age effects and the influence of varying proportions of terrestrial and marine dietary protein on the stable nitrogen-isotope compositions of pig bone collagen and soft tissues from a controlled feeding experiment. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, 2(1), 54-66.
- Welle, S., & Nair, K. S. (1990). Relationship of resting metabolic rate to body composition and protein turnover. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 258(6), E990-E998.
- Welle, S. (1999). Methods for studying protein metabolism in humans. In *Human protein metabolism* (pp. 29-71). Springer, New York, NY.
- Welle, S. (2012). *Human protein metabolism*. Springer Science & Business Media, p. 288. ISBN 978-1-4612-7151-2.
- White, C. D., & Armelagos, G. J. (1997). Osteopenia and stable isotope ratios in bone collagen of Nubian female mummies. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 103(2), 185-199.
- Whiteman, J. P., Elliott Smith, E. A., Besser, A. C., & Newsome, S. D. (2019). A Guide to Using Compound-Specific Stable Isotope Analysis to Study the Fates of Molecules in Organisms and Ecosystems. *Diversity*, 11(1), 8.
- Wood, J. W., Milner, G. R., Harpending, H. C., Weiss, K. M., Cohen, M. N., Eisenberg, L. E., Hutchinson, D. L., Jankauskas, R., Cesnys, G., & Katzenberg, M. A. (1992). The osteological paradox: problems of inferring prehistoric health from skeletal samples [and comments and reply]. *Current anthropology*, 33(4), 343-370.
- Young, V. R. (1991). Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*, 91(7), 828-835.
- Zvára, K., & Štěpán, J. (2006). *Pravděpodobnost a matematická statistika, Praha: Matfyzpress, 230 s.* ISBN 80-86732-71-7.

Elektronické zdroje:

<https://mechanizaceweb.cz>. Počátky mechanizovaného rozmetání hnojiv [online]. ©2001-2018 [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: <https://mechanizaceweb.cz/pocatky-mechanizovaneho-rozmetani-hnojiv/>

Osobná komunikácia:

Informácie k študovanému súboru jedincov poskytol Mgr. Jan Cvrček. Praha 2017-2019.

Konzultácie štatistického spracovania dát s Mgr. Alena Černíková, Ph.D. Praha 2019

16 Prílohy

Tab. 16.1: Kompletný súbor poskytnutého materiálu s číslom vzorky, vekom dožitia a obdobím (v rokoch), kedy daný jedinec žil, a tiež pohlavím a povolaním (statusom) jedinca

vzorka	pohlavie	vek dožitia	povolanie (status)
1	M	90 (1836-1927)	sedliak, mäsiarsky majster
2	Ž	73 (1839-1913)	žena sedliaka
3	M	90 (1863-1954)	sedliak, mäsiarsky majster
4	Ž	43 (1885-1929)	žena sedliaka
5	M	32 (1912-1945)	sedliak
6	M	22 (1943-1966)	syn sedliaka, vojak
7	M	73 (1832-1905)	sedliak a hostinský, mäsiarsky majster, regionálny politik
8	Ž	61 (1839-1901)	dcéra mäsiarskeho majstra a hostinského, žena sedliaka
9	M	62 (1858-1921)	syn sedliaka, kniežací hospodársky správca, spolumajiteľ cukrovaru
10	Ž	59 (1863-1922)	dcéra veľkostatkára, spolumajiteľka cukrovaru a žena v domácnosti
11	M	85 (1862-1948)	roľník, mäsiarsky majster
12	Ž	29 (1864-1895)	dcéra sedliaka
13	M	72 (1866-1938)	syn sedliaka, lekár
14	Ž	37 (1871-1908)	dcéra sedliaka, žena bankára, v domácnosti
15	M	50 (1863-1913)	úradník, bankár
16	Ž	66 (1873-1939)	dcéra meštana a litografa, žena bankára, v domácnosti
17	Ž	49 (1868-1917)	dcéra sedliaka (dedička), hostinská
18	M	64 (1854-1918)	syn kniežacieho hospodárskeho správcu, cisársky a kniežací sládok, regionálny politik
19	M	45 (1895-1940)	syn sládka, sedliak, regionálny politik
20	M	74 (1925-1999)	syn sedliaka, poľnohospodár
21	M	83 (1922-2006)	syn sedliaka, inžinier, staviteľ ciest
22	M	83 (1850-1934)	syn hospodárskeho správcu, pánsky hospodársky správca
23	Ž	72 (1857-1930)	dcéra pánskeho pastiera, žena hospodárskeho správcu
24	Ž	82 (1884-1966)	dcéra hospodárskeho správcu, v domácnosti
25	M	72 (1879-1950)	syn zámočníka, inžinier
26	M	71 (1855-1926)	syn hospodárskeho správcu, žandár, oficiál miestnej správy
27	Ž	79 (1861-1940)	dcéra meštana a staviteľského majstra, žena oficiála miestnej správy
28	Ž	55 (1850-1905)	dcéra mešťanov, v domácnosti
29*	M	48 (1846-1895)	mešťan, učiteľ
30	M	81 (1885-1961)	syn mešťanov, legionár
31	Ž	77 (1844-1921)	dcéra mešťanov, v domácnosti
32	M	66 (1836-1903)	mešťan a obchodník
33	M	67 (1878-1946)	syn meštana a obchodníka, strojvedúci
34	Ž	83 (1867-1951)	dcéra meštana a obchodníka, žena poštmajstra, v domácnosti
35	M	67 (1859-1927)	syn obchodníka, poštmajster
36	M	59 (1899-1958)	syn poštmajstra, kniežací lesník
37	Ž	83 (1887-1970)	dcéra poštmajstra, žena lekára, v domácnosti
38	M	75 (1858-1936)	mäsiarsky majster, obchodník
39	M	81 (1822-1903)	sedliak
40	Ž	56 (1832-1888)	žena sedliaka

vzorka	pohlavie	vek dožitia	povolanie (status)
41	M	61 (1861-1922)	sedliak
42*	M	14 dní (1895-1895)	syn sedliaka
43	M	20 (1897-1917)	syn sedliaka
44*	Ž	74 (1890-1964)	dcéra poštmajstra, žena učiteľa, v domácnosti
45*	M	89 (1889-1978)	učiteľ
46	M	80 (1851-1931)	robotník, želiar
47	Ž	86 (1851-1937)	žena želiara, v domácnosti
48	M	69 (1887-1956)	robotník
49	Ž	82 (1890-1973)	žena robotníka, v domácnosti

*jedinci, ktorí neboli zaradení do spracováanej vzorky, nakoľko u nich nebola prítomná ani jedna z požadovaných kostí (rebro alebo stehenná kosť)

Tab. 16.2: Kompletný súbor jedincov s číslom vzorky a doloženou zdravotnou dokumentáciou

vzorka	významné ochorenia počas života, príčina úmrtia a počet pôrodov u žien
1	Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom.
2	8 detí (1858 – 1874). Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom. Na kostre vrodenný zrast hrudných stavcov a extrémne vybočenie bedrového kĺbu a taktiež zápal predkolenia.
3	Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom. Na kostre zistený <i>Morbus Bechterev</i> .
4	2 deti (1909, 1912). Anamnéza chýba. Príčinou smrti zápal pľúc a mŕtvica. Na čeľustiach zistená veľmi výrazná parodontóza s predčasnou intravitálnou stratou všetkých horných zubov. Zuby plombované nekvalitným amalgámom, k otrave ortuťou však pravdepodobne nedošlo.
5	Násilná smrť zastrelením. Na kostre parodontóza s intravitálnou stratou zadných zubov a zápalovými zmenami v lôžkach.
6	Dva roky pred smrťou vážna autonehoda, utrpel zlomeniny tváre, hrudníku a ľavej ruky, dlhodobo upútaný na lôžko. Príčinou úmrtia bola ďalšia autonehoda, počas základnej vojenskej služby. Zaisťovaný pitevný protokol.
7	Vo ôsmich rokoch pravdepodobný krátkodobý výživový prepád (požiar statku a úmrtie otca ako živiteľa rodiny). Cievné problémy (prítomnosť cievnych malformácií čiastočne na vnútornom povrchu lebky). Príčinou smrti mŕtvica.
8	7 detí (1858 - 1871). V troch rokoch požiar rodného domu a smrť otca ako živiteľa rodiny, písomne doložený dlhodobý sociálne-ekonomický prepád. Zmena až po svadbe v 19-tich rokoch. Na kostre začínajúca frontálna hyperostóza, pravdepodobne trpela vredmi predkolenia. Príčinou smrti bola rakovina hrubého čreva.
9	Syn dvojnásobne príbuzných rodičov. Fajčiar. Počas života prekonal opakované bronchitídy, v posledných rokoch života udával, že trpí neurózou. Príčinou smrti pľúcna tuberkulóza. Zaisťovaný pitevný protokol.
10	3 deti (1890 – 1895). Príčinou smrti pľúcna tuberkulóza. Pri exhumácii zistený syndróm <i>Morgagni-Morel-Stewart</i> (= <i>hyperostosis frontalis interna</i> + hirsutizmus + obezita).
11	Syn dvojnásobne príbuzných rodičov. Fajčiar. Údajne nikdy nebol chorý. Príčinou smrti opotrebovanie organizmu vekom. Na kostre degeneratívno-produktívne zmeny primerané veku, s výnimkou extrémnej koxastrózy vpravo.
12	Bezdetná. Dcéra dvojnásobne príbuzných rodičov, pravdepodobne prítomný nejaký syndróm (podľa syndromologického posúdenia fotografie). Príčinou smrti mŕtvica. Na kostre zistené len veku primerané degeneratívno-produktívne zmeny.
13	Syn dvojnásobne príbuzných rodičov. Príčinou smrti mŕtvica.
14	2 deti (1893, 1899). Dcéra dvojnásobne príbuzných rodičov. Príčinou smrti mozgová embólia.
15	Nemanželské dieťa, otec formálne neznámy, v skutočnosti šlo o bohatého právnicka, ktorý dieťa tajne podporoval. Príčinou smrti diabetes mellitus II. typu.

vzorka	významné ochorenia počas života, príčina úmrtia a počet pôrodov u žien
16	Bezdetná. Príčinou smrti rakovina konečníku. Na kostre miestami veľmi výrazné degeneratívne-produktívne zmeny, v detstve utrpela zlomeninu nosu a čeľusti.
17	4 deti (1891 – 1908). Dcéra dvojnásobne príbuzných rodičov. Minimálne 12 rokov pred smrťou trpela reumatoidnou artritídou (aj počas jedného alebo dvoch tehotenstiev). Príčinou smrti zlyhanie srdca (v súvislosti s iným ochorením).
18	Príčinou smrti zlyhanie srdca a vodnateľnosť.
19	Veľmi vážne chorý od detstva (zápaly pľúc, operované zápaly stredoušnej oblasti). Rok pred smrťou otvorená zlomenina predkolenia s osteomyelitídou a čiastočná amputácia. Fajčiar. Príčinou smrti bronchogénny karcinóm pravého pľúca. Na kostre navyše zistená predčasná úplná osifikácia štítnej chrupavky (zrejme súvisí s nádorovým ochorením), metastázy a parodontóza s výraznou kazivosťou zubov (zubné náhrady zo zlata a iných zliatin). Zaistený pitevný protokol.
20	Príčinou smrti pľúcna embólia. Niekoľko mesiacov predtým prekonal mozgovú mŕtvicu a od tej doby prebýval v sanatóriu. Od asi 40-tich rokov výrazná parodontóza a strata všetkých zubov. Dna.
21	Vážne chorý v detstve (TBC), opakované zápaly pľúc v dospelosti. Príčinou smrti opotrebovanie organizmu vekom. Na kostre zistené ploché osifikácie odpovedajúce prekonaniu TBC. Zaistený pitevný protokol.
22	Karcinóm prostaty. Na kostre zistená zlomenina ruky z mladosti a výrazné množstvo zmiešaných metastáz s prevahou tých osteoplastických.
23	3 deti (1884 – 1889). Skôrnatenie tepien, zmäknutie mozgu a opätovné záchvaty mŕtvice. V kostiach zistené lézie neznámeho pôvodu, pravdepodobne ide však len o pseudopatológiu.
24	Bezdetná, vaječníky neboli vyvinuté. Bronchopneumónia, ťažká skleróza mozgových artérií, staršia encefalomalácia v bazálnych gangliách vpravo, meningeóm vychádzajúci z oblasti strednej jamy vpravo. Zaistený pitevný protokol.
25	Žalúdočné vredy, príčinou smrti pooperačná pľúcna embólia. Počas života úraz hlavy - vrazenie bronzovej násadky pera medzi nosové mušle, nebola však extrahovaná.
26	Príčinou smrti bronchopneumónia a zápal srdечných blán.
27	1 dieťa (1886). Príčinou smrti lalôčkový zápal pľúc.
28	2 deti (1884, 1885). Karcinóm žalúdka.
29*	Diabetes mellitus II. typu. Možná Pagetova choroba na lebke.
30	Anamnéza úplne chýba.
31	7 detí, z toho dva páry dvojčiat (1864 – 1878). Príčinou smrti mŕtvica.
32	Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom.
33	Glaukóm. Príčina smrti mŕtvica.
34	7 detí (1887 – 1899). Glaukóm a rakovina pažeráku.
35	Emfyzém, skôrnatenie pľúc, hnisavý zápal priedušiek a slabosť srdca. Je možné, že trpel TBC.
36	Príčinou smrti pooperačná embólia. Na kostre zistené metastázy bližšie nezisteného karcinómu a chronický zápal pravej ruky.
37	1 dieťa (1910), traumatický pôrod. Glaukóm. Karcinóm hrubého čreva. Na kostre zistený <i>Morbus Bechterev</i> .
38	Príčinou smrti zápal srdečného svalu. Zaistený pitevný protokol.
39	Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom.
40	2 deti (1858, 1861). Príčinou smrti brigtická choroba (zápal obličiek).
41	Príčinou smrti srdečná vada.
42*	Rodičia pokrvne príbuzní. Príčina smrti akútne črevný katar.
43	Pokrvne príbuzní rodičia. Ťažká demencia (celoživotná detencia v ústave pre choromyselných). Príčinou smrti miliárna TBC. Na kostre zistený <i>Morbus Scheuermann</i> . Zaistený pitevný protokol.
44*	2 deti (1921, 1928). Glaukóm a parodontóza. Karcinóm žľazníku. Zaistený pitevný protokol.
45*	Príčinou smrti bolo opotrebovanie organizmu vekom.
46	Príčinou smrti bol krvný opuch mozgu, zomrel náhle.
47	Niekoľko detí, ale bližšie údaje chýbajú. Príčinou smrti bolo ochrnutie srdca, umrela náhle.
48	Opakované zápaly pľúc a TBC pľúc, závažná kachexia. 14 rokov pred smrťou mu bola resekovaná časť žalúdka kvôli vredom. Zaistený pitevný protokol.

vzorka	významné ochorenia počas života, príčina úmrtia a počet pôrodov u žien
49	5 detí, z toho jedny dvojčatá (1914 – 1923). Anamnéza chýba.

*jedinci, ktorí neboli zaradení do spracováanej vzorky, nakoľko u nich nebola prítomná ani jedna z požadovaných kostí (rebro alebo stehenná kosť)

Tab. 16.3: Výsledky izotopovej analýzy zvieracích a kontrolných vzoriek

vzorka	druh	zachovalosť vzorky	obsah uhlíka	obsah dusíka	C:N	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$
		[%]	[%]	[%]		[‰]	[‰]
01fauna	<i>Sus domesticus</i>	19,15	41,00	15,15	3,14	-22,14	5,27
02fauna	<i>Sus domesticus</i>	21,22	40,69	14,87	3,17	-20,04	5,78
03fauna	<i>Sus domesticus</i>	20,62	41,74	15,62	3,10	-21,41	6,99
04fauna	<i>Sus domesticus</i>	12,61	38,99	14,41	3,14	-20,78	6,90
05fauna	<i>Ovis aries/Capra</i>	10,32	35,08	12,79	3,18	-21,05	7,01
06fauna	<i>Gallus domesticus</i>	19,01	34,87	12,74	3,18	-21,00	6,21
07fauna	<i>Gallus domesticus</i>	18,05	37,07	13,37	3,22	-21,50	3,26
08fauna	<i>Bos taurus</i>	21,16	39,75	14,98	3,08	-15,99	4,54
KO 34	<i>Ovis aries</i>	9,60	40,43	15,00	3,13	-22,38	6,87
KO 36	<i>Ovis aries</i>	12,83	44,79	16,71	3,11	-22,43	6,94
KO 38	<i>Ovis aries</i>	6,35	40,88	15,13	3,13	-22,55	7,06
KO 40	<i>Ovis aries</i>	14,84	40,97	15,14	3,14	-22,39	7,05
KO 46	<i>Ovis aries</i>	12,55	39,01	14,45	3,13	-22,60	6,88
KO 47	<i>Ovis aries</i>	13,24	40,54	15,07	3,12	-22,70	7,00

Tab. 16.4: Výsledky izotopovej analýzy ľudských vzoriek. Znamienkom „X“ sú označené neanalyzované vzorky.

vzorka	pohlavie	kosť	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	hmotnosť vzorky [g]	extrahovaný kolagén [mg]	zachovalosť vzorky [%]	C:N	obsah dusíka [%]	obsah uhlíka [%]
1	M	rebro	11,03	-19,87	0,2808	61,8	22,01	3,13	15,86	42,77
		femur	10,79	-19,88	0,0849	14,2	16,73	3,11	15,25	40,89
2	Ž	rebro	11,23	-19,4	0,1701	41	24,1	3,11	16,04	43,05
		femur	10,97	-19,8	0,1397	25,1	17,97	3,09	15,17	40,42
3	M	rebro	11,31	-19,85	0,1379	13,9	10,08	3,13	15,15	40,89
		femur	11,31	-19,61	0,1156	20,4	17,65	3,11	16,3	43,7
4	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,07	-19,67	0,1608	26	16,17	3,09	16,23	43,3
5	M	rebro	11,63	-19,59	0,2456	66,3	27	3,1	16,16	43,15
		femur	10,76	-19,91	0,1315	26,1	19,85	3,1	15,58	41,59
6	M	rebro	11,48	-19,78	0,4195	86,1	20,52	3,09	16,61	44,31
		femur	11,33	-19,78	0,0912	16,5	18,09	3,08	15,58	41,38
7	M	rebro	12,46	-19,42	0,1353	31,1	22,99	3,12	14,1	37,96
		femur	11,92	-19,55	0,1422	29,6	20,82	3,13	14,41	38,91
8	Ž	rebro	11,94	-19,83	0,2418	45,9	18,98	3,12	15,66	42,12
		femur	12,25	-19,97	0,322	61,5	19,1	3,14	15,58	42,21
9	M	rebro	12,33	-19,75	0,411	87,5	21,29	3,11	16,44	44,09
		femur	12,09	-19,61	0,1226	25,2	20,56	3,09	15,77	41,96
10	Ž	rebro	11,3	-20,08	0,1969	37,7	19,15	3,13	17,3	46,7
		femur	11,35	-20,21	0,1668	36,1	21,64	3,09	15,93	42,43
11	M	rebro	11,65	-19,65	0,231	59	25,54	3,12	16,1	43,26
		femur	11,61	-19,46	0,3201	71,5	22,34	3,12	15,59	41,94
12	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,59	-19,9	0,1029	17,4	16,91	3,12	14,42	38,83
13	M	rebro	11,62	-19,71	0,1606	28,7	17,87	3,12	15,2	40,85
		femur	12,03	-19,61	0,1329	24,7	18,59	3,11	17,04	45,63
14	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,59	-19,76	0,0419	8,2	19,57	3,15	13,64	37,07
15	M	rebro	12,3	-19,76	0,2678	62,7	23,41	3,09	16,45	43,75
		femur	11,55	-19,69	0,3222	72,3	22,44	3,11	15,63	41,89
16	Ž	rebro	11,59	-19,7	0,2468	65	26,34	3,1	15,42	41,19
		femur	11,69	-19,7	0,3285	86,1	26,21	3,11	15,89	42,63
17	Ž	rebro	12,08	-19,7	0,2692	42,6	15,83	3,11	16,1	43,23
		femur	11,69	-19,96	0,3013	61,9	20,54	3,12	15,98	42,93
18	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,3	-19,79	0,2538	50,7	19,98	3,1	16,16	43,24
19	M	rebro	12,26	-19,57	0,4447	87,4	19,65	3,08	16,71	44,33
		femur	11,79	-19,34	0,1399	28	20,01	3,12	14,77	39,7
20	M	rebro	10,98	-19,68	0,2385	51,1	21,43	3,11	16,01	42,88
		femur	11,17	-19,57	0,2334	51,2	21,94	3,12	15,65	42,12
21	M	rebro	10,87	-19,66	0,2782	10,1	3,63	3,1	16,15	43,17
		femur	11,16	-19,69	0,1921	40,3	20,98	3,13	15,08	40,62

vzorka	pohlavie	kosť	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	hmotnosť vzorky [g]	extrahovaný kolagén [mg]	zachovalosť vzorky [%]	C:N	obsah dusíka [%]	obsah uhlíka [%]
22	M	rebro	12,8	-18,8	0,1908	77,7	40,72	3,12	15,91	42,75
		femur	11,86	-19,6	0,2498	49,8	19,94	3,13	15,47	41,69
23	Ž	rebro	12,56	-19,85	0,2773	68	24,52	3,12	15,49	41,71
		femur	12,45	-19,69	0,0965	17,2	17,82	3,14	14,1	38,23
24	Ž	rebro	12,08	-19,1	0,3061	64,7	21,14	3,16	16,69	45,44
		femur	12,06	-19,34	0,0646	11,9	18,42	3,16	15,11	41,14
25	M	rebro	12,12	-19,5	0,2725	68,9	25,28	3,11	15,93	42,69
		femur	12,01	-19,57	0,2495	57,3	22,97	3,12	13,53	36,43
26	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,49	-19,62	0,1198	27,8	23,21	3,19	14,14	38,84
27	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,65	-19,41	0,139	23,1	16,62	3,09	15,28	40,69
28	Ž	rebro	12,57	-19,77	0,3252	72,6	22,33	3,09	16,21	43,14
		femur	11,24	-19,74	0,1283	19	14,81	3,11	15,09	40,48
30	M	rebro	11,7	-20,15	0,2846	67	23,54	3,11	16,62	44,49
		femur	11,83	-19,99	0,2443	46,2	18,91	3,13	16,07	43,32
31	Ž	rebro	11,58	-19,85	0,2417	53,3	22,05	3,11	16,01	42,85
		femur	11,32	-20,04	0,148	33,7	22,77	3,12	15,75	42,33
32	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	11,27	-19,74	0,0701	16,3	23,25	3,14	15,82	42,85
33	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	12,04	-19,47	0,1295	23,7	18,3	3,12	15,6	41,92
34	Ž	rebro	11,36	-20,35	0,1187	23,6	19,88	3,1	14,84	39,62
		femur	11,58	-20,18	0,0714	13,2	18,49	3,11	14,62	39,2
35	M	rebro	12,84	-19,79	0,3274	54,9	16,77	3,12	16,08	43,17
		femur	12,35	-19,64	0,1301	24	18,45	3,09	15,33	40,87
36	M	rebro	12,19	-19,8	0,2685	60,6	22,57	3,1	16,44	43,91
		femur	12,24	-20,09	0,1696	32,6	19,22	3,1	15,9	42,47
37	Ž	rebro	11,42	-19,88	0,2628	56,5	21,5	3,1	16,11	43,11
		femur	11,27	-20,15	0,0603	11,8	19,57	3,13	14,78	39,91
38	M	rebro	12,12	-19,47	0,2368	57,5	24,28	3,11	15,52	41,6
		femur	11,6	-19,41	0,186	34,4	18,5	3,1	15,54	41,58
39	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	8,96	-19,94	0,1044	20,3	19,44	3,11	14,59	39,15
40	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	10,19	-20,31	0,2558	55,9	21,85	3,1	16,18	43,16
41	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	10,62	-20,02	0,1953	41,5	21,25	3,1	15,85	42,29
43	M	rebro	10,45	-20,2	0,2526	51,1	20,23	3,08	16,36	43,38
		femur	9,98	-20,03	0,1727	34,6	20,04	3,09	16,15	42,97
46	M	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	10,27	-20,08	0,1187	21,5	18,11	3,09	15,2	40,52
47	Ž	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		femur	10,31	-20,02	0,1416	27,1	19,14	3,1	15,84	42,37

vzorka	pohlavie	kosť	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	hmotnosť vzorky [g]	extrahovaný kolagén [mg]	zachovalosť vzorky [%]	C:N	obsah dusíka [%]	obsah uhlíka [%]
48	M	rebro	10,85	-19,7	0,2504	61,2	24,44	3,12	15,28	41,12
		femur	10,58	-19,56	0,2426	52,7	21,72	3,09	16,2	43,11
49	Ž	rebro	11,9	-20,09	0,216	43,7	20,23	3,08	16,25	43,14
		femur	11,57	-20,2	0,0605	12,8	21,16	3,09	14,98	39,87

Tab. 16.5: Hodnoty atmosférického $\delta^{13}\text{C}$ v časovom rozmedzí 1850-2011 vynesené zo štúdie Ferrio et al. (2005). Časové rozmedzie je rozdelené do troch skupín – do roku 1900, 1900-1965, a po roku 1965.

rok 1850-1899	$\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]	rok 1900-1965	$\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]	rok 1966-2011	$\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]
1850	-6,50	1901	-6,64	1967	-7,11
1852	-6,51	1903	-6,65	1969	-7,15
1855	-6,52	1906	-6,66	1971	-7,20
1857	-6,52	1908	-6,67	1974	-7,26
1860	-6,53	1911	-6,68	1976	-7,33
1862	-6,53	1913	-6,69	1979	-7,40
1864	-6,54	1915	-6,71	1981	-7,48
1867	-6,55	1918	-6,72	1984	-7,56
1869	-6,55	1920	-6,73	1986	-7,62
1872	-6,56	1923	-6,75	1988	-7,69
1874	-6,56	1925	-6,76	1991	-7,73
1877	-6,57	1928	-6,78	1993	-7,78
1879	-6,57	1930	-6,79	1996	-7,83
1881	-6,58	1933	-6,81	1998	-7,92
1884	-6,59	1935	-6,82	2001	-8,00
1886	-6,60	1937	-6,84	2003	-8,06
1889	-6,60	1940	-6,86	2004	-8,11
1891	-6,61	1942	-6,88	2005	-8,13
1894	-6,62	1945	-6,90	2006	-8,15
1896	-6,63	1947	-6,91	2007	-8,17
1898	-6,64	1950	-6,94	2008	-8,20
		1952	-6,96	2009	-8,22
		1954	-6,98	2010	-8,24
		1957	-7,01	2011	-8,26
		1959	-7,03		
		1962	-7,06		
		1964	-7,08		

Tab. 16.6: Úprava hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí. Vzorky sú zoradené podľa rozdielu medzi prvým umretým jedincov a iným jedincom, ktorý zomrel neskôr.

vzorka	od	do	počet rokov	priemer $\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]	rozdiel	pôvodná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	nová hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]
40	1852	1888	36	-6,55	0,00	-20,31	-20,31
39	1842	1903	61	-6,56	0,01	-19,94	-19,93
7	1852	1905	53	-6,58	0,03	-19,55	-19,52
8	1860	1901	41	-6,58	0,03	-19,97	-19,94
32	1857	1903	46	-6,58	0,03	-19,74	-19,71
2	1860	1913	53	-6,60	0,05	-19,80	-19,75
28	1870	1905	35	-6,60	0,05	-19,74	-19,68
12	1886	1895	9	-6,61	0,06	-19,90	-19,84
31	1864	1921	57	-6,62	0,07	-20,04	-19,96
1	1857	1927	70	-6,63	0,08	-19,88	-19,81
18	1874	1918	44	-6,63	0,08	-19,79	-19,71
15	1883	1913	30	-6,64	0,09	-19,69	-19,60
14	1891	1908	17	-6,64	0,09	-19,76	-19,67
9	1879	1921	42	-6,64	0,09	-19,61	-19,52
26	1875	1926	51	-6,65	0,10	-19,62	-19,53
41	1881	1922	41	-6,65	0,10	-20,02	-19,92
46	1871	1931	60	-6,65	0,10	-20,08	-19,98
17	1888	1917	29	-6,66	0,11	-19,96	-19,85
10	1883	1922	39	-6,66	0,11	-20,21	-20,11
35	1880	1927	47	-6,66	0,11	-19,64	-19,53
22	1871	1934	63	-6,67	0,12	-19,60	-19,48
23	1878	1930	52	-6,67	0,12	-19,69	-19,57
47	1871	1937	66	-6,67	0,12	-20,02	-19,90
38	1881	1936	55	-6,68	0,13	-19,41	-19,27
27	1881	1940	59	-6,70	0,15	-19,41	-19,27
13	1886	1938	52	-6,70	0,15	-19,61	-19,46
42	1917	1917	0	-6,72	0,17	-20,03	-19,87
4	1906	1929	23	-6,72	0,17	-19,67	-19,50
16	1893	1939	46	-6,72	0,17	-19,70	-19,53
11	1883	1948	65	-6,72	0,17	-19,46	-19,28
3	1884	1954	70	-6,75	0,20	-19,61	-19,42
34	1888	1951	63	-6,75	0,20	-20,18	-19,98
33	1899	1946	47	-6,76	0,21	-19,47	-19,27
25	1898	1950	52	-6,76	0,21	-19,57	-19,36
19	1915	1940	25	-6,78	0,23	-19,34	-19,11
30	1900	1961	61	-6,82	0,27	-19,99	-19,72
48	1907	1956	49	-6,82	0,27	-19,56	-19,29
24	1904	1966	62	-6,84	0,29	-19,34	-19,05
5	1933	1945	12	-6,85	0,30	-19,91	-19,61
36	1919	1958	39	-6,87	0,32	-20,09	-19,77
37	1907	1970	63	-6,87	0,32	-20,15	-19,83
49	1911	1973	62	-6,90	0,35	-20,20	-19,85

vzorka	od	do	počet rokov	priemer $\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]	rozdiel	pôvodná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	nová hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]
6	1964	1966	2	-7,09	0,54	-19,78	-19,23
20	1945	1999	54	-7,30	0,75	-19,57	-18,82
21	1943	2006	63	-7,42	0,87	-19,69	-18,82

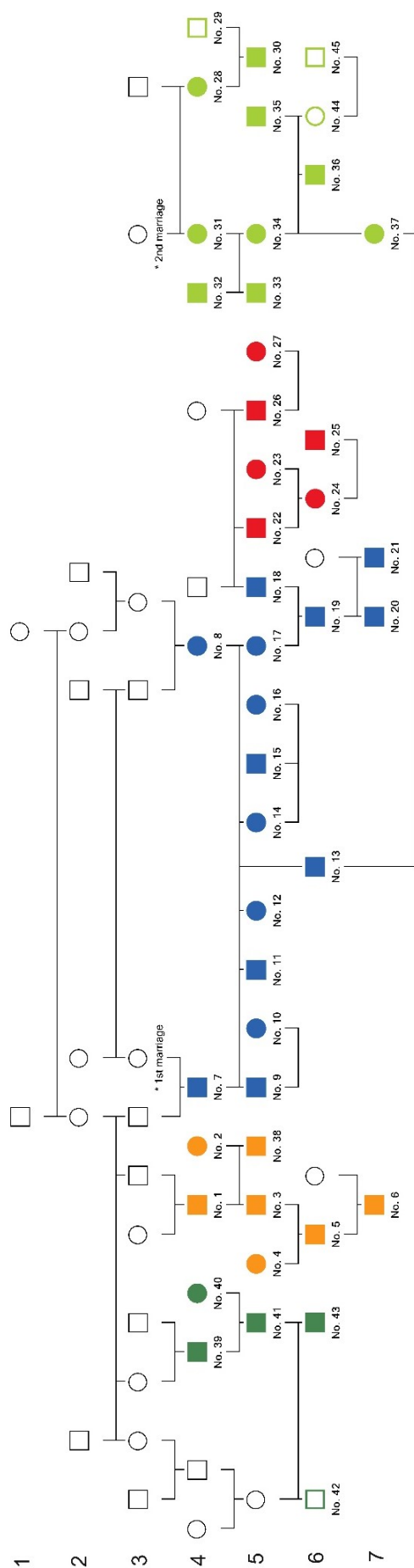
Tab. 16.7: Úprava hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ rebier. Vzorky sú zoradené podľa rozdielu medzi prvým umretým jedincov a iným jedincom, ktorý zomrel neskôr.

vzorka	od	do	počet rokov	priemer $\delta^{13}\text{C}_{\text{vzduchu}}$ [‰]	rozdiel	pôvodná hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	nová hodnota $\delta^{13}\text{C}$ [‰]
8	1891	1901	10	-6,63	0	-19,83	-19,83
7	1895	1905	10	-6,64	0,01	-19,42	-19,41
28	1895	1905	10	-6,64	0,01	-19,77	-19,76
2	1903	1913	10	-6,67	0,04	-19,40	-19,35
15	1903	1913	10	-6,67	0,04	-19,76	-19,71
17	1907	1917	10	-6,69	0,06	-19,70	-19,63
9	1911	1921	10	-6,71	0,08	-19,75	-19,68
31	1911	1921	10	-6,71	0,08	-19,85	-19,77
42	1917	1917	0	-6,72	0,09	-20,20	-20,11
10	1912	1922	10	-6,72	0,09	-20,08	-19,99
1	1917	1927	10	-6,75	0,12	-19,87	-19,75
35	1917	1927	10	-6,75	0,12	-19,79	-19,67
23	1920	1930	10	-6,76	0,13	-19,85	-19,72
22	1924	1934	10	-6,78	0,15	-18,80	-18,65
38	1926	1936	10	-6,79	0,16	-19,47	-19,31
13	1928	1938	10	-6,81	0,18	-19,71	-19,53
16	1929	1939	10	-6,82	0,19	-19,70	-19,51
19	1930	1940	10	-6,82	0,19	-19,57	-19,38
5	1935	1945	10	-6,86	0,23	-19,59	-19,36
11	1938	1948	10	-6,88	0,25	-19,65	-19,40
25	1940	1950	10	-6,90	0,27	-19,50	-19,23
34	1941	1951	10	-6,92	0,29	-20,35	-20,06
3	1944	1954	10	-6,94	0,31	-19,85	-19,54
48	1946	1956	10	-6,95	0,32	-19,70	-19,38
36	1948	1958	10	-6,97	0,34	-19,80	-19,46
30	1951	1961	10	-7,01	0,38	-20,15	-19,77
24	1956	1966	10	-7,06	0,43	-19,10	-18,67
37	1960	1970	10	-7,08	0,45	-19,88	-19,42
6	1964	1966	2	-7,09	0,46	-19,78	-19,31
49	1963	1973	10	-7,16	0,53	-20,09	-19,56
20	1989	1999	10	-7,79	1,16	-19,68	-18,52
21	1996	2006	10	-8,03	1,40	-19,66	-18,26

Tab. 16.8: Pôvodné a upravené hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ stehenných kostí a rebier

vzorka	kosť	pôvodné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	upravené hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	vzorka	kosť	pôvodné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	upravené hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ [‰]
1	femur	-19,88	-19,81	1	rebro	-19,87	-19,75
2	femur	-19,8	-19,75	2	rebro	-19,4	-19,35
3	femur	-19,61	-19,42	3	rebro	-19,85	-19,54
4	femur	-19,67	-19,5	5	rebro	-19,59	-19,36
5	femur	-19,91	-19,61	6	rebro	-19,78	-19,31
6	femur	-19,78	-19,23	7	rebro	-19,42	-19,41
7	femur	-19,55	-19,52	8	rebro	-19,83	-19,83
8	femur	-19,97	-19,94	9	rebro	-19,75	-19,68
9	femur	-19,61	-19,52	10	rebro	-20,08	-19,99
10	femur	-20,21	-20,11	11	rebro	-19,65	-19,4
11	femur	-19,46	-19,28	13	rebro	-19,71	-19,53
12	femur	-19,9	-19,84	15	rebro	-19,76	-19,71
13	femur	-19,61	-19,46	16	rebro	-19,7	-19,51
14	femur	-19,76	-19,67	17	rebro	-19,7	-19,63
15	femur	-19,69	-19,6	19	rebro	-19,57	-19,38
16	femur	-19,7	-19,53	20	rebro	-19,68	-18,52
17	femur	-19,96	-19,85	21	rebro	-19,66	-18,26
18	femur	-19,79	-19,71	22	rebro	-18,8	-18,65
19	femur	-19,34	-19,11	23	rebro	-19,85	-19,72
20	femur	-19,57	-18,82	24	rebro	-19,1	-18,67
21	femur	-19,69	-18,82	25	rebro	-19,5	-19,23
22	femur	-19,6	-19,48	28	rebro	-19,77	-19,76
23	femur	-19,69	-19,57	30	rebro	-20,15	-19,77
24	femur	-19,34	-19,05	31	rebro	-19,85	-19,77
25	femur	-19,57	-19,36	34	rebro	-20,35	-20,06
26	femur	-19,62	-19,53	35	rebro	-19,79	-19,67
27	femur	-19,41	-19,27	36	rebro	-19,8	-19,46
28	femur	-19,74	-19,68	37	rebro	-19,88	-19,42
30	femur	-19,99	-19,72	38	rebro	-19,47	-19,31
31	femur	-20,04	-19,96	42	rebro	-20,2	-20,11
32	femur	-19,74	-19,71	48	rebro	-19,7	-19,38
33	femur	-19,47	-19,27	49	rebro	-20,09	-19,56
34	femur	-20,18	-19,98				
35	femur	-19,64	-19,53				
36	femur	-20,09	-19,77				
37	femur	-20,15	-19,83				
38	femur	-19,41	-19,27				
39	femur	-19,94	-19,93				
40	femur	-20,31	-20,31				
41	femur	-20,02	-19,92				
42	femur	-20,03	-19,87				
46	femur	-20,08	-19,98				
47	femur	-20,02	-19,9				

vzorka	kost'	pôvodné	upravené	vzorka	kost'	pôvodné	upravené
		hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	hodnoty $\delta^{13}\text{C}$			hodnoty $\delta^{13}\text{C}$	hodnoty $\delta^{13}\text{C}$
		[‰]	[‰]			[‰]	[‰]
48	femur	-19,56	-19,29				
49	femur	-20,2	-19,85				



Obr. 16.1: Rodokmeň súboru skúmaných jedincov s výnimkou nepříbuzných vzoriek č. 46-49. Jednotlivé rodiny (zdieľané domácnosti) sú farebne rozlíšené.